

dc_509_12

MTA DOKTORI PÁLYÁZAT

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Ionáramok dinamikája és koordinációja
az emlős kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja alatt**



BÁNYÁSZ TAMÁS

DEBRECEN, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

Fejezet	Oldalszám
1. ÖSSZEFOGLALÁS	3
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
4. CÉLKITŰZÉSEK	16
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
5.1. Sejtizolálás	18
5.2. Morfológiai módszerek.....	18
5.3. Elektrofiziológiai módszerek.....	19
5.4. Ca^{2+} indikátoros mérések.....	22
5.5. Kontrakciós mérések.....	23
5.6. Matematikai modellezés.....	23
6. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	25
6.1. Szerkezeti és funkcionális változások a szívizomsejtek tárolása során.....	25
6.2. Az AP Clamp technika továbbfejlesztése: Szekvenciális AP Clamp módszer	31
6.3. Áramprofilok az AP alatt – faji és regionális eltérések	34
6.4. A kamrai szívizomsejtek membránáramainak koordinációja	46
6.4.1. Az akciós potenciál és az ionáramok koordinációja	46
6.4.2. Az ionáramok közötti koordináció	71
6.5. Az SR elemi kalciumfelszabadulási jelenségeinek koordinációja.....	76
7. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	93
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95
9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	96

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban összefoglalt kutatások célja az volt, hogy kísérletes módszerekkel tanulmányozzuk a szív ionáramainak az akciós potenciál kialakításában játszott szerepét, valamint a létrejött feszültségprofil ionáramokra gyakorolt moduláló hatását. Azt kívántuk megérteni, hogy a közös kommunikációs közegen, a membránpotenciálon keresztül az egyes ionáramok miként koordinálják egymás működését. Azt is vizsgáltuk, hogy milyen mechanizmus révén hangolják össze az ionáramok a működésüket az akciós potenciál alakjának meghatározásában. Tanulmányoztuk az ionáramok szív ciklus alatti aktivációját, inaktivációját és reaktivációját, valamint ezek lehetséges szerepét a normális, vagy kóros akciós potenciál kialakításában. Vizsgáltuk, hogy egy adott ionáram megváltozott lefutása miként módosítja az akciós potenciál alakját, ezen keresztül pedig a többi ionáram működését.

A fentiekén kívül elemeztük az akciós potenciál szíven belüli epicardialis-endocardialis, illetve csúcs-bázis irányú heterogenitása mögött álló ionmechanizmusokat. Tanulmányoztuk, hogy a szív akciós potenciáljának frekvenciafüggő funkcionális és morfológiai változásait milyen, az ionáramok működésében megfigyelhető változások hozzák létre. A vizsgálatok emlős kamrai szívizomsejteken történtek és kiterjedtek a legfontosabb ismert ionáramokra ($I_{Ca,L}$, I_{Cl} , I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}).

Mivel a szívizom ionáramainak működésében a sejt kalcium háztartása központi szerepet tölt be, tanulmányoztuk a sarcoplasmaticus reticulum kalcium felszabadító mechanizmusának működésében megfigyelhető koordinációs jelenségeket. Megmértük a sparkok közötti kapcsolat erősségét és távolságfüggését.

A vizsgálatok elvégzéséhez az általánosan elterjedt elektrofiziológiai és fluorescens módszereket alkalmaztuk. Az új megközelítés miatt azonban szükség volt néhány már korábban is elérhető metodika továbbfejlesztésére. Kidolgoztuk a szekvenciális akciós potenciál clamp módszert, amely képes több ionáram akciós potenciál alatti mérésére egyazon sejtben. A sparkok vizsgálatához pedig egy automatikus spark detektáló és elemző programot írtunk, amely alkalmas a sparkok tömeges feldolgozására.

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Magyarázat
ANTRA	Antracén-9-karboxilsav
AP	Akciós Potenciál
APD - APD ₂₀ , APD ₅₀ , APD ₇₅ , APD ₉₀	Action Potential Duration - Az akciós potenciál hossza általános értelemben, illetve 20, 50, 75 illetve 90%-os repolarizáció értéknél mérve
APEX	A kamra csúcsa, illetve csúcs közeli régiója
BASE	A kamrának a szív bázisához közeli régiója
Chromanol	Chromanol-293B
CRU	Calcium Relase Unit
DAD	Delayed Afterdepolarization
EAD	Early Afterdepolarization
ENDO	Endocardialis
EPI	Epicardialis
FFF	Fordított Frekvencia Fügő (hatás)
FWHM	Full Width at Half Maximum, a sparkok szélességének mértéke
I _{Ca,L}	L-típusú kalcium áram
I _{Cl}	Klorid áram
I _{K1}	Befelé egyenirányító kálím áram
I _{Kr}	A késői egyenirányító kálím áram gyors komponense
I _{Ks}	A késői egyenirányító kálím áram lassú komponense
I _{NCX}	Na ⁺ /Ca ²⁺ csereáram
I _{to}	Tranziens outward kálím áram
RTTA	Relative T-tubule Area = Konfokális felvételen a T-tubulusok területének a sejt teljes területére normált nagysága
RyR	Ryanodine Receptor
SR	Sarcoplasmic Reticulum

3. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szív egy komplex, nemlineáris dinamikai rendszer, melyben közel húsz ionáram alakítja ki a sejtek mechanikai aktivitását vezérlő elektromos szignált, az akciós potenciált (AP) [1, 2]. Ezt a komplexitást tovább növeli a sejt felszíni és sarcoplasmaticus reticulum (SR) membránon áthaladó Ca^{2+} áram. Mindezek az áramok szorosan csatoltak, vagyis bár önálló szabályozással rendelkeznek, közvetlenül, vagy közvetve hatással vannak egymásra. Ezek a komplex szabályozási viszonyok teremtik meg a lehetőséget a szív számára, hogy az élet során adódó legkülönbözőbb helyzetekhez (nyugalom, fizikai munka, pszichés hatások, stressz... stb.) alkalmazkodni tudjon. Amennyiben a szív nem tud alkalmazkodni, a következmények fatálisak. Mivel a nyugati típusú társadalmakban a szív eredetű halál vezeti a halálozási statisztikát, a szív elektrofiziológiájának megismerése már évtizedek óta kiemelt kutatási terület. Ezen belül elsődleges fontosságú annak megértése, hogy a különböző ionáramok hogyan működnek együtt az AP megformálásában egészséges, vagy kóros viszonyok között.

Azt, hogy az egyes ionáramok hogyan működnek együtt az AP kialakításában, hagyományosan két különböző megközelítésben tanulmányozhatjuk. Az egyik megközelítés matematikai modellek segítségével rekonstruálja az ionáramok AP alatti profilját [3-5]. A modellben alkalmazott függvények és azok konstansai nagyrészt olyan hagyományos voltage clamp kísérletekben meghatározott adatokra alapulnak, amelyeket élettanitól eltérő ionösszetételű közegben, négysszög, esetleg rámpa alakú parancsjel alkalmazásával határoztak meg [6, 7]. Szofisztikált parancsjelek alkalmazásával így meghatározható az ioncsatornák számos biofizikai tulajdonsága, aktivációs és inaktivációs paraméterek, vagy nyitva- illetve zárva-tartási időtartamok. Amikor ezeket a paramétereket arra használjuk, hogy segítségükkel rekonstruáljuk egy, vagy több ionáram AP alatti lefutását, a módszer implicit módon arra a feltételezésre épül, hogy az élettani viszonyok és a kísérleti körülmények közötti jelentős eltérések ellenére az ioncsatornák mindkét esetben ugyanúgy fog működni. Ez a feltételezés azonban nemcsak nem bizonyított, de már a legkorábbi AP rekonstrukciós próbálkozások során komoly ellenérvek merültek fel ellene. Elég csak az L-típusú kalcium áram ($I_{\text{Ca,L}}$) AP alatti lefutásával kapcsolatos ellentmondó tapasztalatokat példaként megemlíteni. A hagyományos voltage clamp adatokra alapozva a csatorna inaktivációs kinetikájára a különböző források többféle leírást is adtak [3]. Ezek mindegyike

megfelelően egybevágott a hagyományos, négyszög alakú parancsjelet alkalmazó voltage clamp kísérletekben megfigyeltekkel, de az $I_{Ca,L}$ AP alatti viselkedésére alapvetően különböző megoldásokat adtak. Míg a hagyományos modell a plató alatt monoton módon csökkenő $I_{Ca,L}$ -t jósolt, Rasmusson féle modellben az $I_{Ca,L}$ -nak hosszú, fenntartott szakasza volt. A Hadley-Hume féle inaktivációs modell értelmében pedig az $I_{Ca,L}$ az AP harmadik fázisa alatt jelentősen reaktiválódna és egy, a korai felszálló szárnál is magasabb farokáramot képezne [3]. Minden ellentmondásossága ellenére, a szív elektrofiziológiájával kapcsolatos jelenlegi ismereteink nagyrészt ilyen adatokra alapulnak.

Az ionáramok AP alatti lefutásának meghatározását célzó másik metodika mentes az előzőekben tárgyalt hibáktól. Az Akciós Potenciál Clamp néven ismert módszer élettani ionkoncentrációk mellett, a sejt saját AP-je segítségével méri a kívánt áramot [8-14]. Ily módon extrapolációk helyett a kívánt áramot közvetlenül mérhetjük meg. A módszer közel húsz évvel a hagyományos voltage clamp eljárás szív elektrofiziológiai bevezetése [15] után került kidolgozásra és valószínűleg a magas technikai követelmények miatt ma sem tekinthető széles körben elterjedtnek [16].

Ha megbízható módon ismerjük az ionáramok AP alatti lefutását, lehetőségünk van megvizsgálni a közöttük fennálló kapcsolatokat, csatolásokat. Tanulmányozhatjuk, hogy az egyes áramok milyen módon járulnak hozzá az AP egyes szakaszaihoz, milyen mértékben vesznek részt a depolarizáció és repolarizáció meghatározásában, illetve együttműködésük milyen szabályozási mechanizmusokra alapul. Röviden, vizsgálhatóvá válik az ionáramok koordinációja. Az ionáramok koordinációjának egyik kézenfekvő módja a membránpotenciálon keresztül történő kommunikáció. Amikor egy ionáram aktiválódik, a membránpotenciált az áramot szállító ion egyensúlyi potenciáljának irányába mozdítja. A membránpotenciál változás a többi ioncsatorna aktivációs és inaktivációs sebességét módosítani fogja, mely a többi ionáram működésében és így a feszültségprofil alakulásában tükröződni fog. Disszertációm célja azon vizsgálataink során nyert eredmények bemutatása, amelyekben a kamrai szívműködés ionáramainak AP alatti lefutását és a közöttük feltárható koordinációs jelenségeket tanulmányoztuk. A szívműködésnek a membránpotenciál mellett egyik legfontosabb vezérlő szignálja a sejtplazma Ca^{2+} koncentrációja. Mivel egyrészt a Ca^{2+} kiemelt jelentőségű áramok ($I_{Ca,L}$, $I_{Ca,T}$) töltéshordozója, másrészt számos ionáram modulátora, természetes módon adódott az SR Ca^{2+} felszabadító mechanizmusainak tanulmányozása is.

3.1. Módszertani fejlesztések

A koordinációs vizsgálatok csakis megbízhatóan mért ionáramokon végezhetőek el. Ezért a kutatási cél megvalósításához szükség volt bizonyos módszertani előrelépésekre.

3.1.1. A sejtekben a tárolás során bekövetkező morfológiai és funkcionális változások megfigyelése

Az izolált sejteket a legtöbb laboratórium az izolálást követő 6-12 órán belül tekinti felhasználhatónak. A hosszabb időn át történő tárolás, illetve kultúrában történő fenntartás érdekében az elmúlt években jelentős erőfeszítések történtek. Ezen erőfeszítéseket nem egyszerűen gazdaságossági, hatékonysági vagy etikai megfontolások alapján tették. Bizonyos metodikák (expressziós vizsgálatok, elektromos, humorális, vagy mechanikai remodelling tanulmányozása) az izolált sejtek 48-72 órán át kultúrában történő tartását igénylik [17-19]. Növekvő számú megfigyelés látszik igazolni, hogy a kultúrában tartott, vagy egyszerűen csak 12-24 órán túl tárolt izolált szívizomsejtek nem őrzik meg korlátlanul izoláláskori tulajdonságaikat, hanem a tárolási környezethez adaptálódnak, minek következtében bennük szerkezeti és funkcionális átalakulások zajlanak le [20-25]. Több munkacsoport igyekezett kifejleszteni olyan tenyésztési, tárolási technológiát, amely biztosítja a szívizomsejtek szeparáláskori tulajdonságainak megőrzését [21, 26-30], de a probléma korántsem tekinthető megoldottnak. Mindezen körülmények ismeretében indokolt kísérleti modellünkben egy olyan megbízhatósági teszt elvégzése, amelynek során megvizsgáljuk, hogy az általunk izolált sejtek mennyi ideig őrzik meg eredeti tulajdonságaikat. Célszerű a vizsgálatokat a várható felhasználási időn (24-48 órán) túlra kiterjeszteni, hogy ha bizonyos trendek csak később válnak felismerhetővé, azokkal már korábban is számolhassunk. Ez irányú vizsgálatainkat ezért a frissen izolált sejtek előállítását követően öt napon át folytattuk.

3.1.2. A Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technika jelentősége

Az AP Clamp technika mintegy húszéves fejlődése alatt folyamatos tökéletesítéseken ment keresztül, de valamennyi továbbfejlesztési lépés során megőrizte azt az alapvető jellemzőjét, hogy egy sejten csupán egyetlen áram megmérése volt lehetőség [16]. Az általunk célként kitűzött koordinációs vizsgálatok azonban sokkal megbízhatóbban végezhetőek el, ha az ionáramok ugyanazon sejtben kerülnek meghatározásra. Ezért célul tűztük ki, hogy megalkossuk az AP Clamp technika továbbfejlesztett változatát, az általunk Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technikának nevezett módszert, amely

alkalmas több ionáramnak egyetlen sejtől történő meghatározására. A módszert sikeresen kidolgoztuk, publikáltuk [6], részletes leírása a Módszerek fejezetben található.

3.1.3. Új, automatizált módszer a sparkok detektálására

Az SR Ca^{2+} felszabadító mechanizmusában megfigyelhető koordinációs jelenségek vizsgálatához több ezer spark elemzésére volt szükség, amely a hagyományos, egyenként történő manuális módszerrel kivihetetlen. Ezért módszertani fejlesztésként első lépésben egy automatikus spark felismerő és elemző program elkészítését tűztük ki célul. Az új módszer megbeszélése a sparkok tulajdonságaival való szoros tematikai összefüggése miatt az Eredmények és Következtetések című fejezetben történik.

3.2. Ionáramok koordinációja

A koordinációs viszonyok tanulmányozásához Ap Clamp módszerrel jellemezzük az egyes ionáramok AP alatti lefutását, illetve tanulmányozzuk, hogy az áram gátlását követően az AP konfigurációban milyen változások figyelhetők meg. Amennyiben a vizsgált áram a szíven belül regionális inhomogenitást mutat, ennek karakterizálását is elvégezzük.

3.2.1. Ionáramok transmuralis heterogenitása

Jellegzetes területi eltérések figyelhetők meg az AP alakjában a kamrafal egyes rétegei között az emlősfajok jelentős részében [31-36]. Ez a transmuralis heterogenitás a legerősebb kutya esetén, ahol a subepicardialis (EPI) sejtek AP-jének első fázisában egy mély incisura található, létrehozva ezzel a jellegzetes „spike and dome” konfigurációt. Ezzel szemben az endocardialis (ENDO) oldalon található sejtek AP-jén lapos plató szakasz figyelhető meg [31]. A két felületes réteg közötti részt az M-sejteknek nevezett (MID), a szívizomzat mintegy 80%-át kitevő réteg alkotja [35, 37, 38]. M-sejtek azonban nem csak ebben a régióban találhatóak, hanem a két felületes réteg sejtjei közé keveredve is előfordulnak [39, 40].

Az AP morfológiájában található transmuralis heterogenitás okai már régen ismertek. Az EPI AP-k incisuráját létrehozó tranziens outward áram (I_{to}) nagy denzitásban van jelen EPI sejtekben, szinte teljesen hiányzik az ENDO sejtekből és átmeneti expressio szinten mutatható ki MID sejtekben. Feltételezhető azonban, hogy a jellegzetes AP inhomogenitást okozó I_{to} -n kívül további ionáramok is rendelkeznek valamilyen fokú transmuralis heterogenitással. Ilyen adatok kutya kamrai sejteken ez ideig nem kerültek közlésre. Munkánk során célul tűztük ki a főbb ionáramok és a létrehozásukban szerepet

játszó ioncsatornák fehérje expressziós szintjének transmuralis irányú jellemzését, korrelációjuk vizsgálatát.

3.2.2. Az egyes ionáramok szerepe az AP kialakításában

Az ionáramok AP formálásában betöltött szerepének megismerése jelentőségét tekintve messze túlmutat az elméleti kutatások körén. A szív eredetű halálozás hátterében az egyik leggyakoribb tényező a szívritmuszavarok akut, vagy krónikus formája [41-45]. A ritmuszavarok kezelésében, nem meglepő módon, több olyan készítmény használatos, melyek hatásukat az ionáramok modulálásán keresztül fejtik ki [46-48]. Az egyes ionáramok és az AP feszültségprofilja közötti koordináció megértése tehát közvetlen klinikai jelentőséggel bír.

3.2.2.1. Az L-típusú kalcium áram szerepe az AP alakításában

Az AP plató fázisának legfontosabb depolarizáló árama nemcsak elektromos töltésszállítóként vesz részt az AP formálásában, hanem az általa szállított Ca^{2+} -ok központi szignalizációs szerepe is kiemelt fontosságú. Azon túl, hogy $I_{\text{Ca,L}}$ a kontraktilis rendszer aktiválásához szükséges Ca^{2+} -t szállítja a sejtbe, a systole-diastole ciklus során változó $(\text{Ca}^{2+})_i$ révén a kalcium érzékeny ionáramokat is modulálja [49-51]. Ismert, hogy amplitúdójának növekedése jelentősen megnöveli a ritmuszavarok kialakulásának kockázatát [51-54]. Bár kísérletesen igazolni nem sikerült, az áram AP alatti reaktivációját tartják a korai típusú utódepolarizációk (EAD: Early Afterdepolarization) egyik lehetséges okának [55-57]. Az AP felszálló szárát követően gyorsan aktiválódik, majd a vizsgált fajtól függően különböző ütemben lecseng. A plató fenntartásában sokáig kizárólagos funkciót tulajdonítottak neki [3, 11-13], de az utóbbi években közölt adatok fényében már biztosnak látszik, hogy ebben a szerepében a késői típusú nátrium árammal ($I_{\text{Na,L}}$) osztoznia kell [58-61]. Munkánk során elsősorban a $I_{\text{Ca,L}}$ AP alatti profilját, annak transmuralis heterogenitását és az áram patológiás viszonyok között játszott lehetséges szerepét kívántuk tanulmányozni.

3.2.2.2. A klorid áram szerepe az AP alakításában

A kamrai szívizomsejtek klorid áramainak elektrofiziológiai jelentőségét illetően ismereteink sok bizonytalanságot tartalmaznak. A bizonytalanság egyik legfőbb oka, hogy a membrán két oldala között a Cl^- koncentráció megoszlási viszonya, ennek következtében a Cl^- egyensúlyi potenciál pontos értéke nem ismert. Az irodalomban található értékek nagy része indirekt következtetésre alapul. Nem meglepő

módon, bár az egyensúlyi potenciál becsült értékét a legtöbb tanulmány -65 és 40 millivolt közé teszi, annak pontos értékében is több tíz millivoltos eltérést találunk a különböző források esetében [62-64]. A probléma megkerülésére a vizsgálatokat gyakran szimmetrikus Cl^- tartalmú közegben végzik, amely lehetővé teszi a klorid csatorna biofizikai vizsgálatát, de nem segít megérteni a Cl^- élettani szerepét [63, 65]. A nagyfokú bizonytalanságot tovább növeli, hogy az eddig megismert Cl^- csatornák számos intracelluláris szabályozó faktor (Ca^{2+} koncentráció, cAMP szint, ozmotikus aktivitás) szabályozása alatt állnak [62, 64]. Ennek következtében a sejt mindenkori állapota, szignalizációs szintjeinek aktivitása a klorid áram (I_{Cl}) nagyságát jelentősen befolyásolja. A Cl^- áramok vizsgálatát napjainkban erősen megnehezíti az a tény, hogy valóban specifikus, kis koncentrációban hatékony gátlószerekkel nem rendelkezünk.

A sok bizonytalanság ellenére viszonylagos egyetértés áll fenn abban a tekintetben, hogy pozitív membrán potenciál értékeken a klorid áram (I_{Cl}) a repolarizációhoz járul hozzá [62, 64]. A repolarizáció előrehaladtával, ahogy a membrán potenciál közelít a Cl^- egyensúlyi potenciál értékéhez, ez a hozzájárulás fokozatosan csökken, majd a negatívabb feszültségértékeken az áram már depolarizáló hatású. A depolarizáló áramirány miatt felvetődött annak lehetősége is, hogy a I_{Cl} közvetlenül részt vesz a késői utódepolarizációk létrehozásában is. A Szigeti és *mtsai* által javasolt modell értelmében az SR-ből történő spontán Ca^{2+} felszabadulás nemcsak a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ csereáramot aktiválja, hanem a Ca^{2+} érzékeny Cl^- áramot is; megfigyeléseik szerint az I_{Cl} a DAD létrehozásához szükséges áram felét is szolgáltathatja [65]. Jelen munka keretei között két cél megvalósítását tűztük ki. Egyrészt, AP clamp módszerrel meg kívántuk határozni a kutya kamrai izomsejt Cl^- áramának (I_{Cl}) AP alatti lefutását. Ehhez az antracén-9-karboxilsav (ANTRA) érzékeny áramot mértük meg. Másrészt azt kívántuk vizsgálni, hogy ebben a modellben az I_{Cl} gátlása hogyan befolyásolja az utódepolarizációk kialakulását. Az általunk használt gátlószer több Cl^- áramot is gátol. Ezért megfigyeléseink nem specifikusak a Cl^- áramok egy adott típusára, a diskusszióban is az általános I_{Cl} megnevezést használjuk nem feledve, hogy ez a megnevezés egy több, heterogén tagból álló csoportot takar.

3.2.2.3. A késői egyenirányító kálium áramok szerepe az AP alakításában

Részben talán az I_{Ks} kis amplitúdójából eredő technikai nehézségekre vezethető vissza, hogy az áram AP alakításában betöltött szerepével kapcsolatosan meglehetősen szélsőséges vélemények ismertek. Míg találhatunk olyan adatokat és következtetéseket az irodalomban, hogy az I_{Ks} a kamrai szívműködés egyik fontos, az AP hosszát meghatározó árama [66-68], addig más adatok arra utalnak, hogy az áram szerepe elhanyagolható [69, 70]. Az áram szerepére vonatkozó következtetések nagy részét olyan

kísérletekből vonták le, amelyekben az I_{Ks} gátlását követő AP hossz változását elemezték. A kísérletek egy részében a gátlást követően az AP hosszának határozott nyúlását figyelték meg [66-68, 71], míg más beszámolók szerint a nyúlás jelentéktelen mértékű volt, vagy alatta maradt a szignifikancia szintnek. Ezeket az eltéréseket kezdetben interspecies, vagy a kísérletek körülményeiben jelenlévő különbségeknek tulajdonították, de a megfigyelések számának növekedésével egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy az ellentmondó adatok magyarázata máshol keresendő. Varró és *mtsai* megfigyelése szerint Purkinje rostokon az I_{Ks} hozzájárulása az AP repolarizációjához az APD növekedésével egyre jelentősebbé válik [72]. Mások azt találták, hogy kutya [73] és humán [74] kamrai sejteken az I_{Ks} repolarizációhoz való hozzájárulásának mértéke megnő a beta adrenerg ingerlés hatására, ami közismerten rövidíti az AP-t. Ugyanakkor ismert volt, hogy *in vivo* körülmények között - altatott kutya modellben – az I_{Ks} gátlás teljes beta blokádnál is nyújtja az AP-t [68]. Feltételezésünk szerint a diverz megfigyelések hátterében az AP morfológiája és az I_{Ks} közötti komplex kapcsolat állhat, amit csakis az AP feszültségprofiljának és az I_{Ks} kinetikájának összehasonlító mechanisztikus vizsgálata tárhat fel.

3.3. A sparkok koordinációja

Koordinációs jelenségeket nemcsak az ionáramokon tételezhetünk fel, hanem az elemi kalcium felszabadulási jelenségeken, a sparkokon is. Minthogy a Ca^{2+} a sejtek legismertebb és talán legtöbbet tanulmányozott regulátora, az ionáramok működésének megismeréséhez, koordinációs viszonyainak leírásához szükséges a sparkok működésében tapasztalható koordinációs jelenségek feltárása. A sparkok koordinációja alatt azok összehangoltságát értjük.

3.3.1. Jelenlegi ismereteink a sparkok közötti kapcsolatról

A kalcium felszabadító egységek (CRU: Calcium Release Unit) az SR felszínén található Ryanodine receptorokból (RyR) álló diszkrét struktúrák. Térbeli elkülönítésük esszenciális az excitációs-kontrakciós kuplung működéséhez. Ha az egyes CRU-k nem volnának térben elkülönítve, egyetlen Ryanodine receptorból történő spontán kalcium felszabadulás az egész sejtre kiterjedő regeneratív jellé válhatna [75]. A CRU-k működésének diszkrét jellege a sparkokban nyilvánul meg [76-79]. A sparkok az SR-ből történő lokalizált Ca^{2+} felszabadulás eredményeként jönnek létre. Mai ismereteink szerint a CRU-k elhelyezkedése az SR membránjában igen szabályos. A Z-vonal mentén mért távolságuk elektron mikroszkóppal 0.3-0.4 μm [80], RyR ellenes antitestek segítségével, konfokális mikroszkóppal mérve 0.65-1 μm [81, 82], míg a sparkok közötti távolság alapján becsülve 0.8-2 μm -nek adódik [83, 84]. A

szívizomsejtek hossz tengelye mentén a CRU-k távolsága megfelel a Z-vonalak távolságának, azaz $\approx 2 \mu\text{m}$ [81, 85]. Ezek a távolságértékek nyilvánvalóan szükségesek lehetnek annak megakadályozására, hogy a Ca^{2+} jel kontrollálatlanul terjedjen végig az SR-en, ugyanakkor nem teszik lehetetlenné az egyes CRU-k közötti kommunikációt. Bizonyos körülmények között a Ca^{2+} diffúziója révén a CRU-k közötti kommunikáció lehetőséget teremthet kalcium hullámok kialakulására [86-88]. Ezen túlmenően, Parker és *mtsai* megmutatták, hogy a sparkok közelében gyakrabban tűnnek fel újabb sparkok mint a sejt távolabbi részein. A jelenség magyarázatként feltételezték, hogy a CRU-k közötti kommunikáció révén egy spark képes újabb sparkokat kiváltani [83], vagyis a sparkok képesek koordináltan megjelenni. Ezen triggerelt sparkok kizárólag olyan *line scan* felvételeken voltak láthatóak, ahol a detektor a Z-vonalakkal párhuzamos irányultságú volt, vagyis a sejtek hossz tengelye mentén a sparkok kommunikációját nem sikerült kimutatni. Ezt a megfigyelést jól alátámasztja az az ismert tény, hogy a Z-vonallal párhuzamosan a CRU-k távolsága $0.5\text{-}1 \mu\text{m}$ között van, míg a sejtek hossz tengelyével párhuzamosan a távolság több mint $2 \mu\text{m}$. Hasonló megfigyelésekről vázizom sejteken is beszámoltak [89]. Jelenlegi tudásunk szerint tehát a sparkok képesek a környezetükben található CRU-k aktiválására, azaz újabb sparkok kiváltására. Az előzőek figyelembevételével feltételezhető, hogy egy adott spark annál könnyebben tudja aktiválni a környezetében található inaktív CRU-t, minél közelebb helyezkedik az el hozzá. Munkánk során célul tűztük ki ennek az aktiválásnak a tanulmányozását. Meg akartuk ismerni két ok-okozati viszonyban álló spark kapcsolatának erősségét, a kapcsolat távolságfüggését, tehát azokat a tényezőket, amelyek a sparkok koordinációját meghatározzák.

3.3.2. A sparkok koordinációjának gyakorlati jelentősége

A sparkok (RyR-ok) jellemzőinek pontos megismerése révén érthetjük meg az elektromechanikai kapcsolat pontos működését a szívben. A szívizomsejten belül terjedő Ca^{2+} jel koordinálja az SR-ből történő Ca^{2+} felszabadulást, ily módon a mechanikai aktivitást [90]. Az, hogy a szomszédos RyR-ok működése milyen mértékben összehangolt, illetve az összehangolásban milyen szerepet játszik a közöttük létrejövő direkt kapcsolat, közvetlenül befolyásolja a sejt ciklus során megfigyelhető Ca^{2+} koncentráció változásokat, ennek következtében a Ca^{2+} -függő ionáramok, vagy a mechanikai válasz dinamikáját. Ezen túl ismertek patológiás viszonyok, amikor néhány spark egyesülése révén sejtben belül tovaterjedő Ca^{2+} hullámok jöhetnek létre [86, 87], amelyekről tudott, hogy abnormális AP-t válthatnak ki, ritmuszavart eredményezve [91-94]. A probléma tehát egyrészt elméleti jellegű, másrészt azonban közvetlen klinikai vonatkozásai is vannak.

3.3.3. Az esőcsepp analógia

A sparkok látványa a kamrai szívizomsejteken sok hasonlóságot mutat a pocsolák felszínére hulló esőcseppek által kiváltott hullámgyűrűkkel. Egy ilyen hullám elvileg két úton jöhet létre. Elsősorban kiválthatja egy, a felhőkből lehulló esőcsepp. A becsapódó esőcsepp azonban időnként további szertefröccsenő vízcseppeket kelt a víz felszínén, melyek kis távolságon belül lehullva újabb hullámgyűrűket váltanak ki: ez a második lehetőség (40. ábra). Amikor a sparkok koordinációjának megismerése céljából az individuális sparkok közötti kapcsolat erősségét, illetve a kapcsolat erősségének távolságfüggését kívánjuk tanulmányozni, a feladat hasonló ahhoz, mintha meg akarnánk mondani, hogy mennyi annak a valószínűsége, hogy a pocsolák felszínén látható hullámgyűrűt egy korábbi esőcsepp által adott távolságban szétföccsentett vízcsepp váltotta ki. Első megközelítésben természetes megoldásként kínálkozik a lehetőség, hogy minél közelebb van egy spark az őt időben megelőző sparkhoz, annál valószínűbb, hogy ok-okozati viszony áll fenn közöttük. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni a tényt, hogy stochasticus eseményekről lévén szó, egy sparkot (esőcseppet) követő újabb spark (esőcsepp) azonos valószínűséggel jelenik meg a sejt (pocsolák) minden pontján, így a korábbi spark (esőcsepp) szomszédságában is. Vagyis, két spark esetén az együttes, vagy időben közeli megjelenés egyaránt utalhat ok-okozati viszonyra, vagy koincidenciára. A feladat ilyenformán annak meghatározása, hogy egy spark pár esetén a távolság miként befolyásolja az ok-okozati viszonyt, illetve a koincidenciát. A kitűzött feladat megoldására statisztikai módszert választottunk, amelynek eredményeit matematikai modell segítségével kívántuk ellenőrizni, illetve megerősíteni.

3.3.4. A munkahipotézis megfogalmazása és tesztelése

A statisztikai módszerrel ellenőrizhető munkahipotézist így fogalmaztuk meg: ha az egyes sparkok között ok-okozati viszony áll fenn, a sparkok környezetében egy újabb spark kialakulási valószínűségének nagyobbnek kell lennie mint a nagyobb távolságban mértnek. A munkahipotézis megfogalmazásakor két biológiai szempontból indokolt feltételt adottnak vettünk. Egyrészt feltételeztük, hogy a sparkok kapcsolata kizárólag erősítő jellegű, vagyis egy spark kizárólag fokozhatja és sosem csökkentheti egy másodlagos spark kialakulási valószínűségét. Másrészt feltételeztük, hogy a távolság növekedésével a sparkok közötti kölcsönhatás erőssége csökken.

Amennyiben a sparkok között nincs ok-okozati viszony, az elsődleges spark környezetében a sparkok kialakulási valószínűsége azonos azzal, amit távolabb mérhetünk. Minél erősebb kapcsolat van két spark között, annál nagyobb eltérésnek kell mutatkoznia a spark szomszédságában és a sejt távolabbi területein

mérhető kialakulási valószínűségek között. Meg kell határozni tehát valamennyi spark esetén a többi sparktól mért térbeli távolságot és időbeli különbséget (kapcsolási idő). Ezekből az adatokból lehetővé válik a sparkok kialakulási valószínűségének meghatározása a távolság függvényében. Mivel a feltételezett kölcsönhatás távolságfüggéséről semmiféle előzetes ismerettel nem rendelkezünk, úgy döntöttünk, hogy becslés, vagy prekonceptiók alapján felállított statisztikai osztályok helyett megkonstruáljuk a sparkok kialakulási valószínűségének távolság függését, más megfogalmazással eloszlás görbét (valószínűség versus távolság). Amennyiben a sparkok kialakulása között nincs ok-okozati viszony (nulla kapcsolat), az eloszlásfüggvény egy egyenes kell legyen, hiszen ha a sparkok azonos valószínűséggel fordulnak elő a szívizomsejtek teljes területén, akkor a kialakulási valószínűségük a vizsgált sugárral arányosan nő. Ha a sparkok kialakulása között oksági viszony van, a kapcsolat erősségétől és távolság függésétől függően az eloszlásgörbén egy helyi csúcsnak kell mutatkoznia (41. ábra). Ebben az esetben ha az eloszlásgörbe lineáris szakasza segítségével meghatározzuk a sparkok intrinsic kialakulási valószínűségét (a referencia sparktól olyan távolságban, ahol a kölcsönhatások már nem érvényesülnek), ezt levonva a kialakulási valószínűségből (A panel) megkapjuk a kapcsolat erősségének távolságfüggését (B panel).

3.3.5. Korlátozó tényezők és azok megoldása - a vizsgálat kiterjesztése

A sparkok kumulatív kialakulási valószínűsége elméletileg a távolság növelésével arányosan növekedne a végtelenig (végtelen nagy méretű sejt esetén), ezzel fokozva az intrinsic kialakulási valószínűség robusztusságát. Azonban a szívizomsejtek véges kiterjedése miatt amint egy adott sparktól mért távolság eléri a sejt legközelebbi szélét, a kumulatív kialakulási valószínűség csökkenni kezd (ED4 ábra, C panel). Ez erősen behatárolja a statisztikai módszerek (pl. lineáris regresszió) erejét. Ezt kivédhetnénk azzal, hogy a kialakulási valószínűségeket ne a távolság, hanem a terület függvényében elemezzük, ekkor a sejthatárok elérése miatt nem kellene lemondanunk a sparkok egy részéről. Csakhogy a sparkok közötti kölcsönhatás feltételezhetően nem az általuk behatárolt területtől, hanem távolságuktól függ, vagyis nem válna lehetővé a kitűzött probléma vizsgálata.

További technikai nehézség, hogy egy adott sejtről a fototoxicitás miatt csak rövid - 10 másodpercnél nem hosszabb - felvétel készíthető, amely idő alatt sejtenként kb. 8-10 sparkra lehet számítani. Ez a szám a frekvencia meghatározás szempontjából igen ritka eseménynek felel meg, jelentősen gyengítve a statisztikai módszer megbízhatóságát, erejét.

Mindkét technikai probléma orvosolására ugyanaz a megoldás: a mintaszám növelésével kell fokozni a statisztikai eljárások robusztusságát, azaz a mérést nagy sejtszámon kell elvégezni. Az irodalomban

található korábbi elemzések legfeljebb 20-50 spark vizsgálatára alapultak, az általunk kitűzött cél megbízható eléréséhez azonban több ezer sparkra van szükség. Ilyen nagyszámú spark hagyományos, egyenkénti, manuálisan történő elemzése igen időigényes feladat. Ezért először egy olyan automatikus spark analizáló program elkészítését tűztük ki célul, amely képes több ezer spark megbízható felismerésére és elemzésére. Ekkora adatbázis azonban már jóval több irányban hasznosítható, mint ami létrehozásának közvetlen célja. Ezért a meglévő adatokat más szempontok szerint is hasznosítottuk. Tanulmányoztuk a sparkok gyakoriságának statisztikai jellemzőit, valamint az egyes sparkok morfológiai sajátosságait is.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az emlős kamrai szívizomsejtek ionáramainak akciós potenciál (AP) alatti dinamikáját és koordinációját kívántam megismerni. Tanulmányozni kívántam az egyes ionáramoknak az AP alatti profilját és az AP kialakításában játszott szerepét. Vizsgálni kívántam, hogy az AP feszültségprofilja hogyan hat vissza az egyes ionáramok dinamikájára és a sejtmembrán feszültségváltozásán keresztül az egyes ionáramok hogyan modulálják egymás működését.

Ennek során az alábbi feladatok elvégzését tűztem ki célul:

1. A kísérleti modell, az izolált kamrai szívizomsejt megbízhatóságának, stabilitásának tesztelése. Az izolált szívizomsejtekben az izolálást követően a felhasználásig terjedő időben bekövetkező szerkezeti és funkcionális változások jellemzése.
2. Az Akciós Potenciál Clamp technika továbbfejlesztése. A módszer alkalmassá tétele több ionáram mérésére ugyanazon sejtéből.
3. Az emlős AP alatti legjelentősebb ionáramok ($I_{Ca,L}$, I_{Cl} , I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) profiljának meghatározása. Az áramprofilok szíven belüli inhomogenitásának jellemzése.
4. A vizsgált ionáramok potenciális szerepének tanulmányozása utódepolarizációs aritmiák (EAD, DAD) esetén.
5. Az egyes ionáramok szerepének feltárása az AP kialakításban, alakjának meghatározásában.
6. A kamrai szívizom ionáramai közötti koordinációs jelenségek tanulmányozása.
7. Az $I_{Ca,L}$ AP alatti lehetséges reaktivációjának vizsgálata az áram patológiás szerepének megértése szempontjából.
8. Az I_{Ks} repolarizációban játszott szerepének vizsgálata.
9. Az I_{Ks} potenciális farmakológiai célpontként való vizsgálata, az áram modulálásának terápiás stratégiakénti elemzése ritmuszavarokban.
10. Az I_{Cl} szerepének tisztázása az utódepolarizációs aritmiák kialakulásában.

11. Az intracellularis pH puffereelésében szerepet játszó bikarbonát ion mechanikai válaszban és ritmuszavarokban játszott szerepének tanulmányozása.
12. Az AP paramétereinek (hossz, plató magasság) frekvenciafüggéséért felelős ionáramok tanulmányozása.
13. A fordított frekvenciafüggés néven ismert jelenség mechanizmusának vizsgálata kutya és más emlősök kamrai szívizomában.
14. Olyan automatikus spark felismerő algoritmus/program kifejlesztése, amely lehetővé teszi konfokális mikroszkóppal készült felvételeken nagyszámú spark automatikus detektálását és elemzését.
15. A kamrai szívizomsejteken megfigyelhető sparkok morfológiai sajátosságainak leírása, kiterjedésük szimmetria viszonyainak jellemzése.
16. A sparkok egy sejtre vonatkoztatott gyakoriságának, frekvenciájának meghatározása.
17. A kumulatív és intrinsic kialakulási valószínűségek alapján két spark közötti kapcsolat erősségének és térkonstansának meghatározása kontroll viszonyok között, valamint az SR túltöltését követően (Ca^{2+} overload).

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A disszertációban tárgyalt valamennyi kísérlet elvégzése előtt beszereztük az előírt etikai és szakhatósági engedélyeket. Az állatkísérletes munkákhoz rendelkezünk az intézményi állatkísérleti bizottságok engedélyeivel. Kooperációs munkák esetén az együttműködő intézetek kölcsönösen betartották valamennyi résztvevő intézmény állatkísérletes munkákra vonatkozó előírásait és szabályait.

A kísérletek során használt valamennyi anyag, vegyszer és reagens legalább Sigma-Aldrich "sejtkultúrán tesztelt", vagy annál jobb minőségi fokozatú volt.

5.1. Sejtizolálás

Az elektrofiziológiai kísérletekhez használt szívizomsejtek előállítása enzimatisus módszerrel történt a coronaria rendszeren keresztüli perfúzióval. Kísérleti állatból történő izolálás esetén az állat szívét mély altatásban a mellkas feltárása után kiemeltük. Kisemlősök szívét Langendorf módszerrel perfundáltuk. Kutyszív esetén az elülső leszálló coronaria ág ellátási területét az aorta gyökkel egybefüggően kimetszettük és a bulbus felől kanüláltuk. Humán minták izolálásakor a kapott kamrafal darabokat használtuk fel egy subepicardialis coronaria ágat kanülálva, illetve perfundálva.

Az izolálás során a coronaria ágakon át 50 $\mu\text{M/l}$ Ca^{2+} koncentrációjú szövettenyésztő oldatban (JMEM, SIGMA) 1 mg/ml koncentrációjú collagenase enzimet perfundáltattunk 32 °C-on a szövet elfolyósodásáig. Ezt követően a szövetet enzimmentes perfúziós oldatban diszpergáltuk és többszörös szűrés, valamint ülepítés során a kiszabadult sejteket felszálló Ca^{2+} koncentrációjú oldattal mostuk. A legalább hat lépésből álló mosási sorozat végén a sejtek 2 mM/l Ca^{2+} koncentrációjú oldatban kerültek tárolásra. A tárolás 14 °C-on történt, a sejtek az izolálást követően mintegy 48 órán át jól felhasználhatóak maradtak.

5.2. Morfológiai módszerek

5.2.1. A sejtméretetek meghatározása

A sejtszuspenziót a mérőkádba cseppentettük, majd a sejteket legalább tíz percen át mostuk bikarbonát tartalmú Tyrode oldattal szobahőmérsékleten. Ezt követően az invertált mikroszkóp fotócsatlakozóján keresztül Nikon Coolpix 8800 digitális fényképezőgép segítségével véletlenszerűen kiválasztott területekről felvételeket készítettünk. A felvételek kiértékelésére ImageJ programot használtunk (NIH). A program a sejtek átlagos hosszát, szélességét és diastoles sarcomere hosszát a legnagyobb Fourier állandó alapján határozza meg. A sejtek területét egyenként történő kézi körülrajzolást követően a bezárt pixelek számából határozta meg a program. A terület ilyen módon történő meghatározására azért volt szükség, mert a második naptól a sejtek végei erőteljesen lekerekedtek és a szélességből, valamint hosszából számított terület nem volt megbízható érték.

5.2.2. T-tubulusok kiterjedésének meghatározása

A T-tubulusok kiterjedését fluorescens festékkel történő jelölést követően konfokális mikroszkóppal mértük. A sejteket húsz percen át szobahőmérsékleten 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú di-8-ANEPPS fluorescens festékben inkubáltuk, majd többszörös BTY-ban történő mosást követően Zeiss LSM 5 Live konfokális mikroszkóppal készítettünk sorozatfelvételeket a z-tengely mentén 1 μm -es lépésközökkel, 100x-os objektívvel. A felvételek közül kiválasztottunk egyet, amelyen a mag nem ábrázolódott és ImageJ program (NIH) segítségével meghatároztuk a sejt metszetében a T-tubulusok alapterülethez viszonyított relatív nagyságát (RTTA : Relative T-tubule Area).

5.3. Elektrofiziológiai módszerek

A mérések 500 μl térfogatú plexi mérőkádban készültek, melyben a folyadékcsera sebessége 4-5 ml/perc volt. A kísérletek végzésekor a sejtszuspenzióból egy cseppet transzferpipettával a kádba cseppentettünk, majd néhány perc ülepedést követően megindítottuk a perfúziót. A kísérletekhez szabályos téglalap alakú, tiszta harántcsíkolattal rendelkező sejteket választottunk ki, melyek spontán kontrakciót nem mutattak.

Az elektrofiziológiai kísérleteket 37 °C-on végeztük, hacsak a tudományos probléma nem indokolta eltérő hőmérséklet alkalmazását. Ezen speciális esetekben a használt hőmérséklet az Eredmények fejezetben egyedileg feltüntetésre került. A hőmérsékletszabályozás pontossága 0.5 °C-on belül volt.

Az elektrofiziológiai mérések Axon rendszereken készültek (Axon Instruments, illetve Molecular Device). A kísérletekhez Axoclamp 2B és Axopatch 200B erősítőket valamint Digidata sorozatú analóg/digitális

jelátalakítókat (12xx és 14xx) használtunk, az analóg szűrés 10kHz-en történt. A mérésekhez és a mért jelek elemzéséhez pClamp és ClapFit programokat használtunk.

A mérésekhez használt elektródák boroszilikát üvegből készültek Sutter rendszerű programozható húzókon (Sutter Instruments, Novato CA), közvetlenül a mérés előtt. A soros ellenállást és a sejtek kapacitását a kísérlet során többször ellenőriztük, jelentős változás esetén ($R_m > 50\%$, $C_m > 10\%$) a kísérletet megszakítottuk.

5.3.1. Hagyományos voltage clamp mérések

Kísérleteink során teljes sejtes elrendezésben („whole cell configuration”) dolgoztunk. A hagyományos, vagyis négyszög alakú parancsjeleket, illetve rámpát alkalmazó mérésekhez használt elektródák ellenállása 2.0 - 3.5 M Ω volt. A feltöltést követően a pipettákat a perfúziós oldatba merítve voltage clamp konfigurációban nulláztuk, majd a sejt felszínéhez érintve enyhe szívással létrehoztuk a gigaseal-t, majd kompenzáltuk a soros ellenállást (100%) és a pipetta kapacitását (80%). A betöréshez erősebb szívást alkalmaztunk, majd a sejtet mintegy 10 percen keresztül egyenként 100 ms hosszú -130/-80/-40/+10 mV-os lépcsőkből álló protokollal ingereltük 1 Hz frekvencián. Ez idő alatt a sejtplazma és a pipetta oldat kiegyenlítődött, az áramjelek stabilizálódtak. Amennyiben a sejt áramjelei 10 perc alatt nem stabilizálódtak, a sejtet mérésre nem használtuk fel.

Amennyiben a sejt áramjelei stabilizálódtak, a külső oldatot a kísérleti protokollnak megfelelő összetételűre cserélve a mérés megkezdődhetett.

5.3.2. Akciós Potenciál Clamp mérések

Az AP clamp kísérletekben a mérési elrendezés megegyezett a hagyományos voltage clamp kísérletekben alkalmazottával két fontos különbséggel. Egyrészt a parancsjel - szemben a hagyományos négyszög, esetleg rámpa alakú parancsjelekkel – itt mindig egy AP. Ezen a ponton fontos kiemelni, hogy AP Clamp kísérleteinkben mindig a sejt saját AP-ját használtuk parancsjelként, hacsak a tudományos probléma nem indokolta más sejten rögzített AP használatát. Ilyen eset volt például az EPI-ENDO sejtek összehasonlító tanulmányozása, amikor vizsgáltuk EPI sejteken ENDO AP, illetve ENDO sejteken EPI AP hatásait az ionáramok profiljára. Az eredményekben bemutatásra kerülő AP Clamp módszerrel készült áramprofilokat tehát alapvetően a sejt saját AP-ja alatt rögzítettük, illetve az ellenkező eseteket egyértelműen jelöljük. A másik fontos különbség az AP Clamp kísérletekben az alkalmazott külső- és belső oldatok összetétele. Míg a hagyományos voltage clamp kísérletekben a pipetta oldat és a külső

oldat összetételét úgy választjuk meg, hogy a mérni kívánt ionáram kivételével minden más ionáramot gátoljunk, az AP Clamp kísérletekben törekszünk a membrán mindkét oldalán az élettani viszonyokhoz legközelebb álló ionösszetételt biztosítani. Ennek oka az AP Clamp kísérletek sajátosságos logikája.

A hagyományos voltage clamp kísérletek alapelve, hogy ha a sejt valamennyi ionáramát gátoljuk a mérni kívánt ionáram kivételével, akkor a teljes membránáram (I_m) meg fog egyezni a tanulmányozni kívánt ionárammal. Ennek megfelelően a külső és belső oldatokból lehetőség szerint kihagyjuk mindazon ionokat, amelyek a mérést zavarnák, illetve a mérni nem kívánt ioncsatornákat nagy specificitású gátlószerekkel gátoljuk. Ezzel szemben az AP Clamp kísérletekben úgy járunk el, hogy a későbbiekben mérésre használt AP-t fizioiógias, vagy ahhoz minél közelebb álló viszonyok között Áram Clamp konfigurációban rögzítjük. Amennyiben ezt az AP-t voltage clamp konfigurációban parancsjelként alkalmazzuk ugyanazon sejten, az erősítőnk a teljes elektromos ciklus alatt nulla áramot fog kompenzációs áramként a sejtre adni (eltekintve az AP-t megelőző ingerlőjel alatti szakasztól, ahol a kompenzációs áram nullától különbözik). Ennek oka az, hogy a sejt nem igényel külső áramot saját AP-ja során. Ha ezek után egy ionáramot specifikus gátlószerekkel legátolunk, a kiesett áramot az AP profiljának megtartásához az erősítőnek kell biztosítania. Amennyiben ezt a kompenzációs áramot kivontuk a gátlószerek alkalmazása előtti nulla áramból, megkaptuk a vizsgálni kívánt ionáram AP alatti profilját. Tehát a hagyományos voltage clamp kísérletek során egy mesterséges (négyyszög, rámpa) parancsjel során az élettanitól jócskán eltérő ionösszetételű közegben létrejövő áramprofilot kapunk, amelyből az AP alatti áramprofil bonyolult matematikai módszerekkel határozhatjuk meg. Ezzel szemben az AP Clamp módszerével a tanulmányozni kívánt ionáram AP alatti profilját közvetlenül határozzuk meg az élettanihoz lehető legközelebb álló ionösszetétel mellett.

5.3.3. Current Clamp mérések

Kétféle, kis- és nagy ellenállású elektróddal végzett current clamp módszert alkalmaztunk. Kis ellenállású elektród („pipetta”) esetén az elektróda ellenállása 2.0 – 3.5 M Ω , a nagy ellenállású („hegyes”) elektródák ellenállása 20-30 M Ω között volt. A pipettákat hagyományos kálium aspartat alapú belső oldattal töltöttük fel, a hegyes elektródákhoz 3 mol/l koncentrációjú KCl oldatot használtunk. A két mérés alapelve és technikai kivitelezése ugyan azonos, de pipetta használatakor a pipetta oldat a sejt belső terét dializálja, míg hegyes elektróda esetén dialízis nincs. Pipettával történő mérés esetén a mérési konfigurációt a voltage clamp módszerhez hasonlóan érjük el, míg hegyes elektródás mérésnél az elektróda hegyének kis átmérője miatt a sejtet egyszerűen megsúrjuk, illetve ha szükséges, a betöréshez nagyfrekvenciájú árampulzust („zap”) alkalmazhatunk.

A betörést követően a sejteket általában 1-2 percen át fokozatosan csökkenő erősségű árammal hyperpolarizáltuk és általában 1 Hz frekvencián ingereltük. A folyamatos ingerlést fenntartva az AP paraméterei néhány percen belül stabilizálódtak. Ha a stabilizáció 10 percen belül nem következett be, a sejtet nem használtuk fel méréshez. Current clamp méréseknél a sejteket folyamatosan ingereltük 1 ms szélességű, a küszöböt 20-30%-al meghaladó amplitúdójú négyszögjellel. Az ingerlés a mérő elektródán keresztül történt az erősítő bemenetéhez csatlakoztatott biológiai ingerlő segítségével. Az ingerlő típusának megválasztásakor fontos szempont volt, hogy a nulla érték 10 μV alatt legyen, megelőzendő a nyugalmi membránpotenciál módosítását.

5.4. Ca^{2+} indikátoros mérések

A sejtplazma Ca^{2+} koncentrációjának mérésére az állatmodelltől és a tudományos problémától függően FURA-2 vagy FLUO-4 fluorescens festékeket (Molecular Probes) használtunk. Az indikátort acetoximetilészter formában juttattuk a sejtbe. A töltés szobahőmérsékleten történt, a töltési idő után a sejteket Tyrode oldattal mostuk.

5.4.1. Ca^{2+} Sparkok vizsgálata

A sparkok méréséhez Fluo-4 kalcium indikátort használtunk. Az AM formával 2.5 μM koncentrációban 45 percen át töltöttük a sejteket, melyeket a töltést követően 2-2.5 órán át tudunk felhasználni. A mérések egy részében di-8-ANEPPS indikátort használtunk a T-tubulusok jelölésére. Az indikátort 15 μM végkoncentrációban alkalmaztuk a Fluo-4AM töltés utolsó 15 percében. A sparkok mérése Zeiss 5 Live (Carl Zeiss, Jena, Németország) mikroszkóppal történt. Az indikátort 488 nm-es hullámhosszon gerjesztettük, az emittált jelet 520 nm-es felüláteresztő szűrővel választottuk le. 10 másodperc hosszú felvételeket készítettünk, ahol az egyes 512x512 pixeles, 12 bites képkockák 12.5 ms gyakorisággal követték egymást (80 Hz). A zoom faktort 1-re állítottuk, ami 0.12x0.12 μm kiterjedésű pixeleket eredményezett.

A mérések előtt a sejteket 1Hz frekvencián ingereltük bipoláris, 4 ms hosszú négyszögjelekkel két percen át. A mérés előtt 10 másodperccel az ingerlést megállítottuk. A sparkok feldolgozása saját készítésű programmal történt.

5.4.2. Epifluorescens mérések

Az epifluorescens mérések PTI DeltaScan rendszerrel készültek NIKON Eclipse mikroszkópon. A sejteket szobahőmérsékleten töltöttük fel FURA-2 AM festékkel 40 percen át, majd a feltöltést követően Tyrode oldattal többször átmostuk és felhasználásig szobahőmérsékleten tároltuk. A FURA gerjesztése 340/380 nm-es hullámhosszon, 300 Hz sebességen történt, az emittált fényt 510 nm-es felüláteresztő szűrővel különítettük el.

5.5. Kontrakciós mérések

A sejtek kontraktilis sajátságainak meghatározásához a sarcomerhossz változását mértük. Ezzel párhuzamosan kalcium érzékeny festék alkalmazásával rögzítettük a kalcium tranzienseket is. A mérésre IonOptix rendszert használtunk (IonOptix, Milton, USA), amely a sarcomerhossz és az optikai jel párhuzamos mérésére alkalmas. A sarcomerhossz meghatározása a videokamera jele alapján gyors Fourier módszerrel történt. A kontrakciós mérések szobahőmérsékleten zajlottak, az ingerlés téringerléssel történt 4 ms hosszú bipoláris, supramaximalis négyszögjelekkel. A mérést megelőzően a sejteket legalább tíz percen át állandó frekvenciával ingereltük a kontrakciós paraméterek stabilizálása céljából. Minden sejtről tíz egymást követő kontrakciós jelet vettünk fel, majd egyedi adatfeldolgozást követően a paramétereket átlagoltuk. A kalcium tranziens mérésére Fluo-5F fluorescens festéket alkalmaztunk, melyet AM formában 2.5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban töltöttünk a sejtekbe szobahőmérsékleten.

5.6. Matematikai modellek / „in silico” kísérletek

A szimulációkhoz Windows operációs rendszer alatt futtatott Mathcad 7, 10 és 14-es verziókat (PTC) használtunk. Valamennyi modellkísérletben egyetlen ionáram szerepelt, amelyet „voltage clamp” üzemmódban működtettünk. A modell ellenőrzésére négyszög alakú parancsjeleket alkalmaztunk és az így kapott áramjeleket összevetettük a kísérleteink során mért áramjelekkel. A modell paramétereit úgy állítottuk be, hogy a kalkulált áramjelekből és a laboratóriumunkban hagyományos voltage clamp eljárással rögzített áramgörbékből meghatározott aktivációs és inaktivációs paraméterek 10%-on belüli pontossággal megfeleljenek egymásnak. Amennyiben a használni kívánt ionáram Ca^{2+} függő volt, a modellt egy korábbi kísérletünkben rögzített kalcium tranzienssel egészítettük ki, amelynek diastoles és systoles értékei 200 nM, illetve 1 μM voltak. A kalcium tranziens paramétereit minden kísérletben állandó értéken tartottuk, hogy kivédjük a változó kalcium koncentrációk eltérő szabályozó hatásából

eredő különbségeket. Az áramprofilok kiszámításához korábbi méréseinkből származó AP-kat használtunk. Amennyiben a tanulmányozni kívánt probléma igényelte, az AP-t utólag módosíthattuk is (pl. adott AP hossz mellett megváltoztattuk a plato potenciál értékét). Kizárólag állandó ingerlési frekvencia alkalmazásával végeztünk modellkísérleteket, az elemzésre felhasznált áramgörbéket legalább 100 ciklus előzte meg a számított áramprofil stabilizálása céljából.

6. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

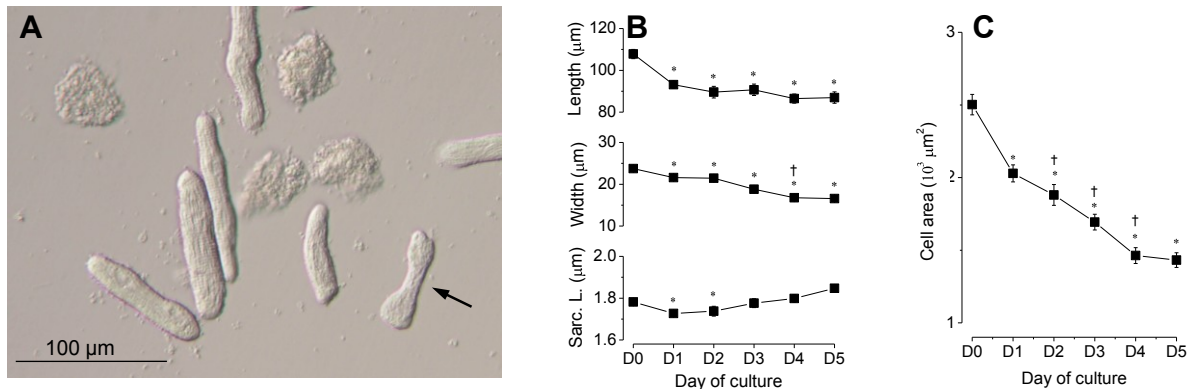
6.1. Szerkezeti és funkcionális változások a szívizomsejtek tárolása során

A viabilitási tesztek célja annak eldöntése volt, hogy az izolálást követően a primaer kultúrában mennyire őrződnek meg a sejtek szerkezeti és funkcionális paraméterei. Mivel a módszereinkkel izolált sejtek az alkalmazott tárolási viszonyokkal általában 24-48 órán át stabil, az izolálás napján mérttől szignifikáns mértékben nem különböző AP-t adnak, ezekkel a mérésekkel kívántuk sejtjeink eltarthatóságát tesztelni. A vizsgálatokra patkány bal kamrai sejteket használtunk, amelyeknek meghatároztuk ugyanazon paramétereit az izolálást követően hat órán belül (ez volt a D0-al jelölt nulladik nap), majd öt egymást követő napon (D1-D5).

6.1.1. Sejtméretek

A méretek vizsgálata során a sejtek hosszát, szélességét, alapterületét és a sarcomerhosszat határoztuk meg a kultúrában tartás során. Általánosan megfigyelhető tendencia volt a sejtek valamennyi vizsgált kiterjedésének csökkenése és a sarcomer hossz rövidülése (1. ábra). A méretek csökkenése mellett a sejtek egy kisebb hányadánál (<5%) polymorf alakzatok kialakulása volt megfigyelhető a tárolás előre haladtával. Egyes sejtek legömbölyödtek, esetleg súlyzó alakot vettek fel, míg mások nyúlványokat növesztettek. Ezeket a sejteket a morfológiai analízisbe nem vontuk be.

A sejtek átlagos hossza az első (D1) napra 107.8 ± 2.2 -ről 93.1 ± 1.75 μm -re csökkent ($p < 0.05$), az ötödik napon (D5) pedig az átlagérték már 86.9 ± 2.73 μm volt. A sejtek szélessége 23.75 ± 0.59 -ről 16.57 ± 0.47 μm -re, a területe 2502 ± 70 -ről 1432 ± 52 μm^2 -re ($p < 0.001$) csökkent öt nap alatt (D5); a csökkenések mértéke már az első napon statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. Az átlagos diastoles sarcomer hosszak a nulladik (D0), az első (D1), illetve a második (D2) napon rendre 1.782 ± 0.008 , 1.730 ± 0.010 és 1.740 ± 0.024 μm voltak ($p < 0.05$) és a második napot követően szignifikáns változást már nem mutattak.



1. ábra. A szívizomsejtek szerkezeti változásai a tárolás során.

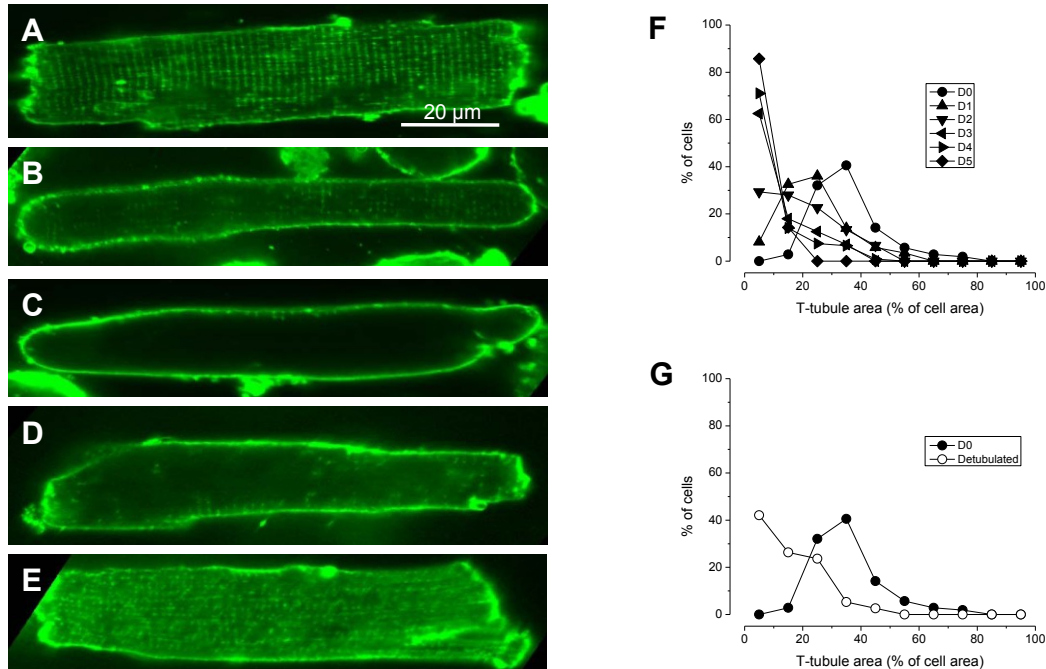
A panel: fáziskontraszt mikroszkóppal készült áttekintő felvétel izolált patkány sejtekről öt nap tárolás után (D5). A sejtek jelentősen lekerekítettek és polymorf alakok jelentek meg. A nyíl egy súlyzó alakú sejtre mutat.

B és C panelek: A sejtek méretének változása öt nap tárolás során. Megfigyelhető a sejtek átlagos hosszának, szélességének és alapterületének csökkenése. A sarcomerhossz az első két napon csökkent, majd visszatért az izolálás után mért értékre.

Az adatok 6 állatból izolált 72-124 sejtben végzett mérések eredményeit mutatják (átlag S.E.) *: $p < 0.05$ az izolálás napján mért értékkel összehasonlítva. †: $p < 0.05$ az előző napon mért értékkel összehasonlítva.

A sejtpopulációban tapasztalt méretbeli változások két különböző módon jöhetnek létre. Vagy a tárolás alatt a nagyobb méretű sejtek gyorsabb pusztulása eredményezhette az átlagok csökkenését, vagy az egyes sejtek méretei csökkentek. Azt, hogy a két lehetőség közül melyik játszik szerepet a tapasztalt változásokban, követéses vizsgálattal próbáltuk eldönteni. A sejtek egy részét hálózatos beosztású tenyésztő edényekben tároltuk (Nunc, Nalge Nunc International), mely edények rácsainak számozása lehetőséget ad az egyes sejtek tárolás alatti beazonosítására. Így kíséreltük meg ugyanazon sejteket öt napon át egyedileg lemérni és a tapasztalt változásokat követni. Meglepő módon azonban a sejtek a tárolási folyamat (pl. tenyésztőoldat csere), illetve a mérés során alkalmazott mozgatás során a helyeikről nagyrészt elmozdultak. A sejtek helybentartása céljából a tenyésztőedények alját lamininnel vontuk be, de ez sem tartotta helyben a sejteket. Ezért a méretbeli változások mögött álló mechanizmust nem sikerült meghatározni.

Korábbi megfigyelések egybehangzóan kimutatták, hogy az izolált szívizomsejtek száma a tárolás során jelentős ütemben csökken. A különböző beszámolók a sejtszám csökkenést az első héten 50-70% között jelölik meg [95-98]. Ez a sejtszám csökkenés azonban, bármennyire is jelentős, valószínűleg nem csökkenti



2. ábra. Patkány szívizomsejtek T-tubulusainak változása a tárolás során di-8-ANNEPS festéssel

A-C panelek: reprezentatív felvételek az izolálás napján (D0), valamint a harmadik (D3) és ötödik (D5) napon. D panel: frissen izolált és detubulált sejtben alig ábrázolódnak a tubulusok. E panel: a detubulálást a festés után végezve jól kirajzolódnak a töredezett tubulusok. F panel: A T-tubulusok területe a tárolás során csökken. G panel: kontroll sejtek T-tubulus területének összehasonlítása akut módon detubulált sejtekével. A mérések 7 állatból származó 107-128 sejten készültek.

a primaer sejt kultúra kísérleti felhasználhatóságát. Ennél sokkal jelentősebb következményekkel járhat az a morfológia változás, ami a tárolás során lezajló dedifferenciálódás eredményeként jön létre. Itt bemutatott adataink arra utalnak, hogy a szívizomsejtekben a morfológiai átalakulás igen gyorsan, már az első két nap során, illetve azt követően bekövetkezik.

6.1.2. A T-tubulusok kiterjedésének változása a tárolás során

A T-tubulus-jelölt sejtek egyszerű megtekintésével felismerhető volt, hogy a sejtek T-tubulus rendszere a tárolás során gyorsan defragmentálódik, a relatív terület pedig jelentősen csökken (2. Ábra). Az ötödik tárolási napra a sejtek nagy része már csak nyomokban tartalmazott T-tubulust. Tapasztalataink szerint a T-tubulusok kiterjedésének mennyiségi becsléseként használt mutató, az RTTA érték (Relative T-tubule Area) igen jelentős sejt-sejt ingadozást mutat egyazon sejtpopuláción belül, akár közvetlenül a sejtizolálást követően is. Emiatt nem találtuk célszerűnek a szokásos átlagértékek és szórások statisztikai elemzését, hanem az RTTA értékek populáción belüli eloszlásgörbéit vetettük össze az egyes tenyésztési napokon. Frissen izolált sejtek esetében (D0) a harang alakú eloszlásgörbe csúcsa a 40%-os RTTA érték

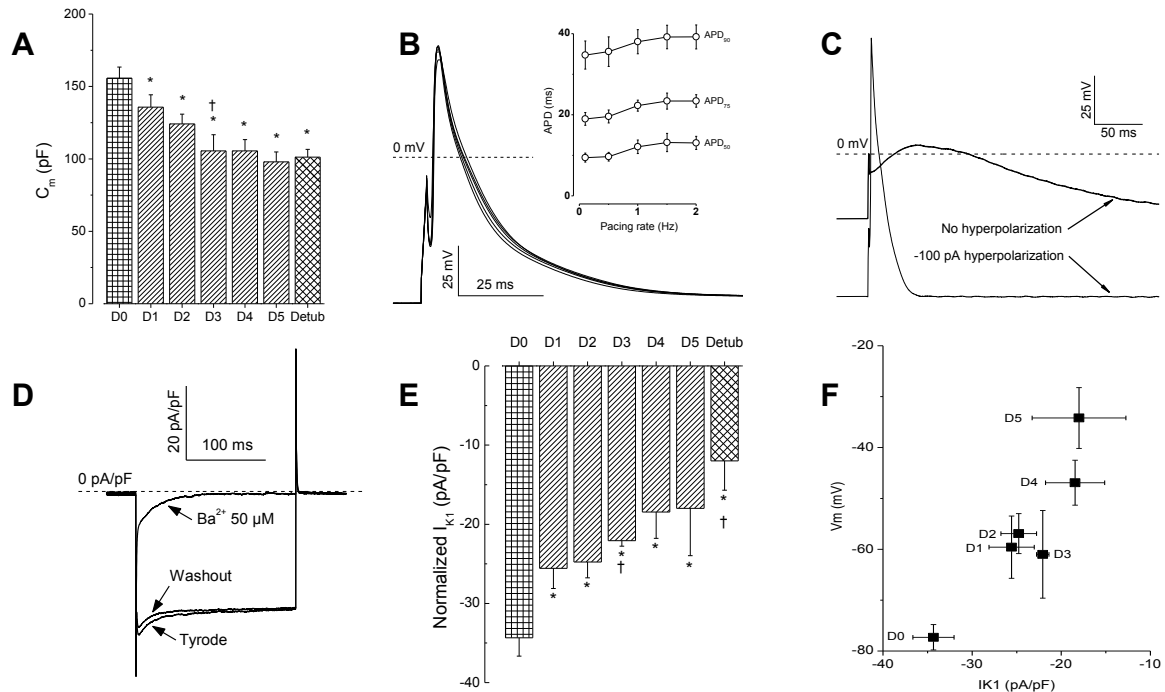
közelébe esik. Az első tenyésztési napra (D1) a gyors detubulálódás miatt ez az érték már 30% alá esik és a második naptól (D2) kezdve a görbe már nem harang alakú, hanem féloldalas, maximuma 10% alatt van, a magasabb RTTA értékek felé pedig monoton módon csökken.

Az RTTA meghatározás megbízhatóságának ellenőrzése céljából megvizsgáltuk, hogy a detubulálás hogyan befolyásolja az RTTA eloszlásgörbét. Az általunk alkalmazott, formamidos detubulálásként ismert eljárás megszakítja a T-tubulus és a sarcolemma közötti összeköttetést, de magát a tubulus rendszert épen hagyja. Mivel a di-8-ANEPPS erős lipid oldékonysága révén végigdiffundál a membránrendszerek mentén, a leszakított tubulusokat nem festi meg. A vizsgálatok során frissen izolált sejteket formamid kezeléssel detubuláltunk, majd di-8-ANEPPS festést követően RTTA értékeiket összehasonlítottuk a nulladik napi eloszlásgörbével. Az ozmotikus detubulálást követően kapott eloszlásgörbe nagy hasonlóságot mutatott a második tárolási napon (D2) megfigyelt RTTA eloszlással. Ezzel egyrészt igazoltuk, hogy a di-8-ANEPPS módszer valóban a T-tubulusokat jelöli, másrészt a kísérleti adatok arra is utalnak, hogy a sejtek tárolása során a T-tubulus rendszer nem feltétlenül tűnik el; nem zárható ki, hogy csupán a sarcolemmával való összeköttetése szakad meg. Bármelyik legyen is a magyarázat a kettő közül, az bizonyos, hogy a T-tubulus azon képessége, hogy az elektromos jelet a sejtfelszínről a sejt mélyebb zónáiba vezesse, a tárolás során jelentősen csökken.

Fenti megfigyeléseink jó egyezést mutatnak korábbi közleményekkel. Több munkacsoport számolt már be a sejt kultúrában tartott szívizomsejtek T-tubulusainak leépüléséről [23, 99-101], de a korábbi beszámolók kizárólag vizuális megfigyelésekre és fényképes dokumentációra korlátozódtak. Tudomásunk szerint az általunk elvégzett mennyiségi elemzés a legelső próbálkozás a T-tubulus degeneráció statisztikus követésére. Ugyanakkor a mi megfigyeléseink utalnak először arra, hogy a tárolás során megfigyelhető T-tubulus degenerációnak tulajdonított sűrűségcsökkenés detubulálódással is magyarázható.

6.1.3. Elektrofiziológiai változások a tárolás során

Az izolálást követően (D0) meghatározott sejtkapacitás átlagértéke 156 ± 8 pF volt, amely a tárolás alatt egyenletesen csökkent, az ötödik napon (D5) elérve a 105 ± 11 pF értéket (3. Ábra). Ez az ötödik napon mért érték nem különbözött szignifikánsan az izolálás napján detubulált sejtek átlagos kapacitásától. Ez a számszerű egybeesés arra utalhat, hogy a tárolás során megfigyelt sejtkapacitás csökkenés valószínűleg a sejtek spontán detubulálódásának következtében jön létre. Másik lehetséges magyarázat a kapacitáscsökkenésre a sejtek kiterjedésében és alapterületében megfigyelt csökkenés lehet. Érdekes módon azonban míg a kapacitás átlagértéke az ötödik napra (D5) 32%-al csökkent, a sejtek alapterülete



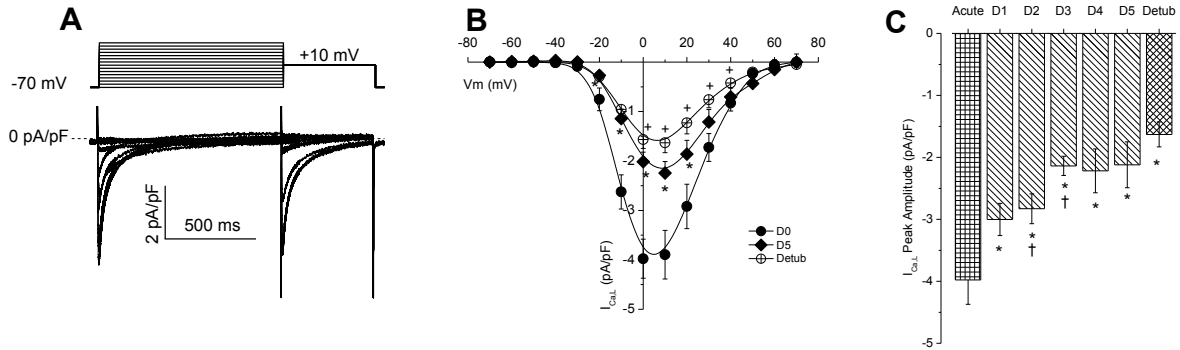
3. ábra. A szívizomsjetelek elektrofiziológiai változása a tárolás alatt

A tárolási idő előrehaladtával arányosan csökken a sejtek kapacitása (A panel). A frissen izolált (D0) sejtek AP-je jó frekvenciafüggő választ ad (B panel), de az első tárolási napot követően a sejtek depolarizációja miatt szabályos AP nem váltható ki. Hiperpolarizáló árammal a nyugalmi membránpotenciál helyreállítható és AP is kiváltható (C panel). A tárolás során csökken a Ba^{2+} érzékeny áramként mért I_{K1} nagysága (D és E panelek). A progrediáló depolarizáció mértéke arányos az I_{K1} csökkenés mértékével.

ugyanekorra 42%-al. A detubulálódás és az alapterület csökkenésének mértékét figyelembe véve meglepőnek találhatjuk, hogy a kapacitás nem csökkent nagyobb mértékben.

Az izolálást követően (D0) a sejtek AP paraméterei (nyugalmi membránpotenciál, AP amplitúdó és szélesség) minden vizsgált ingerlési frekvencián az irodalmi értékeknek megfelelőek voltak. Az ingerlési frekvencia növelésére az AP szélessége megnyúlt (pozitív APD – frekvencia kapcsolat), de az egyes sejtek közötti egyedi APD ingadozások mértéke meghaladta a frekvencia változtatásakor megfigyelhető APD változások mértékét. Az első tenyésztési napon (D1) a sejtek nyugalmi membránpotenciálja jelentősen alacsonyabb volt mint az izolálás napján (D0: -77.3 ± 2.5 mV, D1: -59.6 ± 6.1 mV, $p < 0.001$) és AP-t kiváltani már nem lehetett. Amennyiben a nyugalmi membránpotenciált hiperpolarizáló árammal normalizáltuk, a sejteken szabályos AP-kat tudtunk kiváltani. A további tárolási napok során a sejtek depolarizációja folyamatosan növekedett, végül az ötödik tárolási napon (D5) az átlagérték -24.2 ± 5.9 mV-nak adódott.

Az I_{K1} vizsgálata azt mutatta, hogy a Ba^{2+} érzékeny áram -70 mV-nál mért nagysága a tárolás során egyenesen csökkent és a csökkenés mértéke már az első napon (D1) statisztikailag szignifikánsnak adódott. Az ötödik napra az áram nagysága már az izolálás napján mért érték egyharmadával csökkent.



4. ábra. Az $I_{Ca,L}$ változása a tárolás során

A panel: az $I_{Ca,L}$ mérésére használt mérési protokoll és egy reprezentatív áramfamília. A protokoll alkalmas az áram-feszültség függvényen kívül az aktivációs és inaktivációs paraméterek meghatározására is.

B és C panelek: a tárolás során folyamatosan csökkent az $I_{Ca,L}$ nagysága, de nem változott a feszültségfüggése. Az ötödik tárolási napon mért áram nagysága még szignifikánsan nagyobb volt a frissen izolált és detubulált sejteken mérhető áram nagyságától.

Az adatok 5 állatból izolált 5-9 sejten végzett mérések eredményeit mutatják (átlag \pm S.E.). *: $p < 0.05$ az izolálás napján mért értékkel összehasonlítva. †: $p < 0.05$ a megelőző értékkel összehasonlítva.

Ez az érték ugyanakkor még mindig szignifikánsan nagyobb volt, mint a frissen izolált és detubulált sejtekben mérhető áram nagysága. Érdekes módon a nyugalmi membránpotenciál és az I_{K1} nagysága között lineáris összefüggést találtunk, ami arra utal, hogy az I_{K1} csökkenése a tárolás során meghatározó szerepet tölthet be a kialakuló depolarizációban.

Az L-típusú kalcium áram ($I_{Ca,L}$) nagysága folyamatosan csökkent a tárolás során, de eközben sem a feszültségfüggés, sem a kinetikai paraméterek nem változtak meg. Az ötödik tárolási napra (D5) az áram átlagos nagysága az izoláláskor (D0) mért értéknek már csak mintegy fele volt, de még mindig szignifikánsan meghaladta a frissen izolált, detubulált sejteken mért értékeket. Az $I_{Ca,L}$ csökkenés egyik lehetséges oka a korábban már tárgyalt T-tubulus sűrűség csökkenéssel függhet össze.

Összefoglalva a tárolás során végzett vizsgálatok eredményeit megállapíthatjuk, hogy a tárolás alatt a sejtekben már az első két napon jelentős szerkezeti és működési változások következnek be. Már az első tárolási napon (D1) sem tudtunk AP-t kiváltani, bár ekkor még a vizsgált ionáramok nagyságában bekövetkezett csökkenés mértéke nem volt több a kiindulási (D0) érték 20-25%-nál. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a tárolás során a sejtek funkcionális állapotának az AP lehet a legérzékenyebb

indikátora. Amíg tehát az AP paraméterei az élettani értékeken belül vannak, a sejt többi funkcionális paramétere valószínűleg jól tükrözi az élettani viszonyokat.

A tárolás során megfigyelt elektrofiziológiai változások jó korrelációt mutatnak a korábban bemutatott morfológiai változásokkal. Az ionáramok erősségében kimutatott csökkenés jól magyarázható a T-tubulus sűrűség csökkenésével. Több független megfigyelés utal arra, hogy a befelé egyenirányító kálium áram, az I_{K1} háttérében álló $K_{ir2.1}$ csatorna legnagyobb részben a T-tubulusokban található [102, 103]. Ismert ugyan olyan megfigyelés is, miszerint a detubulálás nem csökkenti az I_{K1} áram nagyságát [104], saját, itt bemutatott kísérleteink azonban azt mutatták, hogy akut detubulációt követően az áram a kontroll érték mintegy egyharmadára csökken. Eredményeink tehát a szívműködés tárolása során tapasztalt változások leírásán túl megerősítik azon megfigyeléseket is, melyek szerint az $K_{ir2.1}$ csatorna dominánsan a T-tubulusban található. A T-tubulusok hasonlóan fontos szerepet játszanak a szívműködés funkciójában kulcsszerepet játszó kalcium belépés szempontjából is. Korábbi megfigyelések már utaltak arra, hogy az $I_{Ca,L}$ során belépő kalcium mennyiségének több mint a fele a T-tubulusokon keresztül éri el a sejtplazmát [105, 106]. Ezzel a megfigyeléssel jó összhangban van azon eredményünk, hogy a detubulálást követően, ami mintegy 30% csökkenést idéz csupán elő a sejtkapacitásban, az $I_{Ca,L}$ erőssége a kontroll érték kevesebb mint felére csökken.

6.2. Az AP Clamp technika továbbfejlesztése: Szekvenciális AP Clamp módszer

A Szekvenciális AP Clamp technika (Sequential Dissection Method, vagy „*Onion Peeling*”) több ionáram mérését teszi lehetővé egyazon szívműködésből annak AP-je alatt. A technika kifejlesztése során elsődleges feladat annak megvizsgálása, hogy az ionáramok mérésének sorrendje befolyásolja-e az egyes ionáramok mérés során megfigyelt paramétereit. Amennyiben ugyanis a gátlószerek alkalmazási sorrendje bármi módon hatással van a mért ionáramok tulajdonságaira, ez erősen korlátozza, esetleg lehetetlenné teszi a módszer alkalmazását.

A vizsgálatba négy ionáramot vontunk be. Az I_{Kr} , I_{Ks} , $I_{Ca,L}$ és I_{K1} áramokat E4031, Chromanol-293B, Nisoldipine és Ba^{2+} érzékeny áramokként határoztuk meg. A mérések során a gátlószerek négy féle sorrendben történő alkalmazását teszteltük. Az egyes sorrendeket a gátlószerek kezdőbetűjéből alkotott szóképpel jelöltük az alábbiaknak megfelelően:

	I. Táblázat: Csatornagátlók alkalmazási sorrendje			
Rövidítés	1.	2.	3.	4.
CENB	Chromanol-293B	E4031	Nisoldipine	Ba ²⁺
ECNB	E4031	Chromanol-293B	Nisoldipine	Ba ²⁺
NCEB	Nisoldipine	Chromanol-293B	E4031	Ba ²⁺
NECB	Nisoldipine	E4031	Chromanol-293B	Ba ²⁺

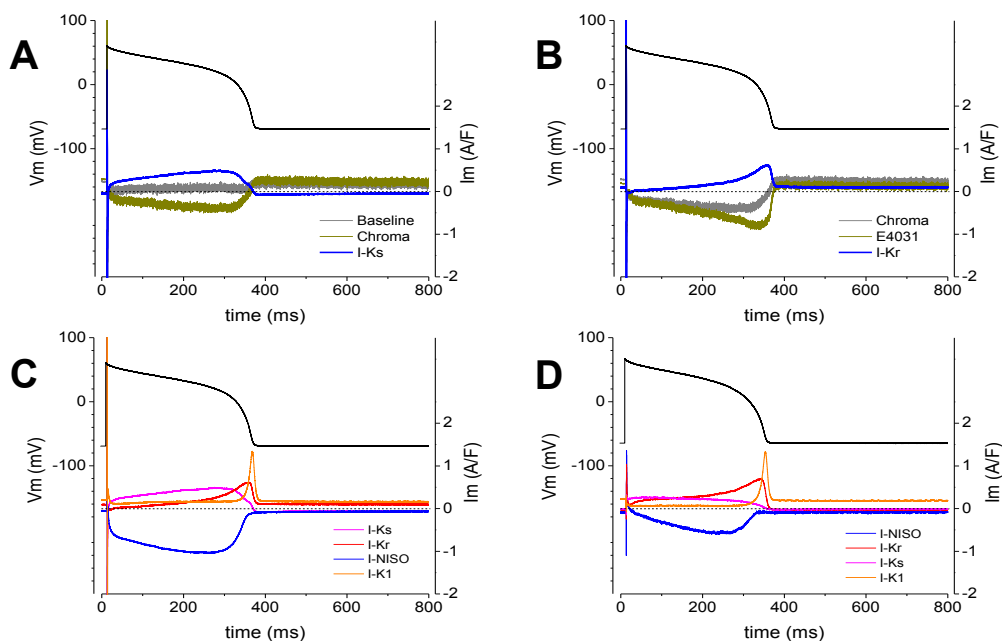
A mérések kivitelezése 21±1 °C-on történt 1Hz ingerlési frekvencián.

6.2.1. Az ionáramok profiljának meghatározása Szekvenciális AP Clamp módszerrel

A mérések a hagyományos AP Clamp technikához hasonlóan a sejt saját AP-jának rögzítésével kezdődtek állandó ingerlési frekvencián. Ezt követően áttértünk voltage clamp üzemmódba a sejt saját AP-ját alkalmazva parancsjelként és felvettük az úgynevezett „nulla áram”-ot. A kádhoz adva az első csatornagátlót a hatás kifejlődését követően rögzítettük a kompenzációs áramot. Ez a kompenzációs áram a „nulla áram”-ból kivonva szolgáltatva az első ionáramot, illetve „nulla áram”-ként szolgált a következő ionáram méréséhez (5. ábra). Ezt a műveletet további csatornagátlók alkalmazásával folytatva sorban megmértük valamennyi ionáramot. Ezt követően más csatornagátló sorrend alkalmazásával újabb szívizomsejteken meghatároztuk ugyanazon ionáramok AP alatti profilját.

Az egyes csatornagátlók segítségével mért AP alatti áramprofilok az alkalmazás sorrendjétől függetlenül nagy fokban hasonlóak voltak. Bár a mért áramerősségek annak ellenére jelentős egyedi különbségeket mutattak, hogy a mért áramértékeket a sejt kapacitására normáltuk, az áramgörbék alakja (kiépülési kinetika, a csúcs helyzete az AP-hez viszonyítva, illetve a lecsengés gyorsasága) alapján az egyes áramtípusok nagy biztonsággal beazonosíthatóak voltak. A különböző sorrendben alkalmazott csatornagátlókkal nyert áramgörbék elemzése során meghatározott paraméterek, úgymint az áramcsúcsok nagysága, kialakulásának ideje, illetve az egyes ionáramok által az AP alatt szállított töltés mennyisége az összehasonlító elemzések során nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget. Hasonlóan az ionáramok paramétereikhez, az egyes alcsoportokban rögzített AP-k paraméterei sem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget.

Az eredmények összefoglalásaként tehát megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatba bevont szerek alkalmazási sorrendje nem befolyásolja a mért áramprofilok tulajdonságait. Ez a következtetés fontos feltétele a



5. ábra. A Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp módszer (SAPC) bemutatása reprezentatív felvételeken.

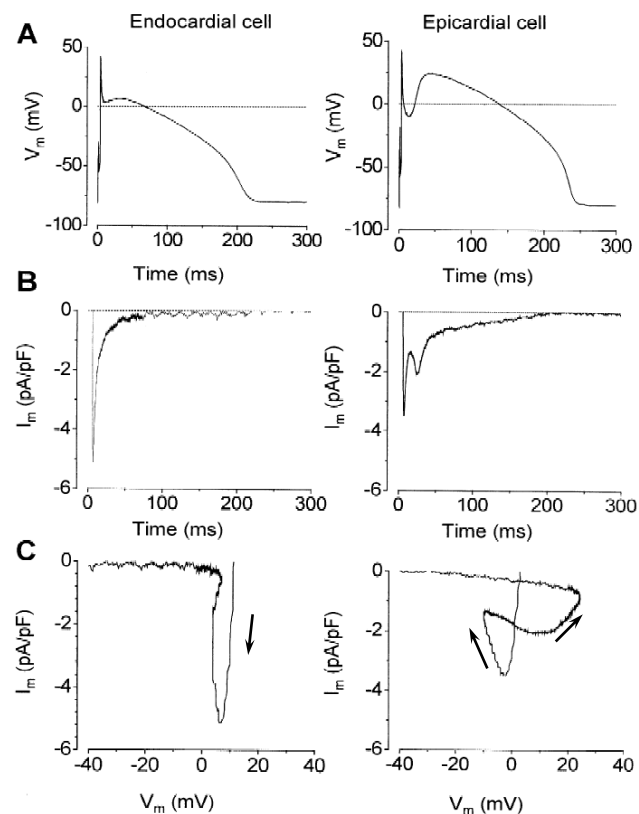
A panel: A SAPC alkalmazása során az első áramgörbe felvételénél a hagyományos AP Clamp technika szerint járunk el. A sejt saját AP-ját használva parancsjelként a nulla áram (Baseline) és a specifikus csatornagátló alkalmazása után rögzített kompenzációs áram (Chroma) különbségéből meghatározható a vizsgálni kívánt áram (I-Ks). B panel: A következő áram mérésekor az előző kompenzációs áramot használjuk null áramként (Chroma) és az újonnan alkalmazott csatornagátló utáni kompenzációs áramot (E4031) ebből kivonva meghatározhatjuk a következő áram profilját (I-Kr). C és D panel: A csatornagátlók alkalmazásának sorrendje nincs hatással a mért áramok alakjára.

módszer alkalmazhatóságának, hiszen lehetővé teszi, hogy a vizsgált tudományos céltól, problémától függően tetszőleges ionáramokat mérjünk meg egy adott sejtben.

A fenti eredmények arra utalnak, hogy a szívizomsejt ionáramai között a membrán pillanatnyi feszültségének értékétől eltekintve további szabályozási kapcsolat nincs, egymástól függetlenül működnek. Ismerve azonban több ionáram kalcium függő szabályozását, meglepőnek tűnhet, hogy a Nisoldipine alkalmazásának sorrendje nem befolyásolta például az I_{Ks} kinetikáját. Az I_{Ks} -ról tudott ugyanis, hogy a háttérben álló ioncsatorna jelentős kalcium érzékenységgel rendelkezik [51], következésképpen feltételezhető, hogy AP alatti profilja az $I_{Ca,L}$ gátlás következtében megváltozhat. Ennek megfelelően az NCEB és NECB csoportokban az I_{Ks} profiljának különböznie kellene a CENB és ECNB csoportokban láthatóaktól, hiszen az $I_{Ca,L}$ gátlás az első esetben megelőzte, míg a második esetben követte az I_{Ks} mérését. A látszólagos ellentmondást feloldhatjuk, ha számításba vesszük, hogy a kísérletekben alkalmazott pipetta oldat 10 mM EGTA-t tartalmazott, ami pufferelte a sejtplazma kalcium tartalmát és ezzel együtt valószínűleg az $I_{Ca,L}$ útján belépő kalciumot is. Ilyen viszonyok között, a sejtplazma kalcium szintje egy állandó értéken marad, tehát az $I_{Ca,L}$ gátlása nem befolyásolja a sejt

6. ábra. $I_{Ca,L}$ lefutása endocardialis és epicardialis sejteken AP Clamp módszerrel meghatározva.

Az A panelen az akciós potenciálok (AP) láthatóak, a B panel mutatja az áramjeleket, a C panelen látható az áram-feszültség görbe. Jól megfigyelhető, hogy a különböző AP konfigurációk eltérő áramprofilal járnak együtt, amely jelentősen megváltoztatja az áram-feszültség kapcsolatot is. A nyílak mutatják az áramhurkok lefutásának irányát. Hasonló megfigyeléseket tettünk 10 ENDO és 14 EPI sejten.



kalcium homeosztázisát. Ennek megfelelően a SAPC biztonságos alkalmazásának feltételeihez egy módszertani megszorítást célszerű hozzáadni: Amennyiben a pipetta oldat nem tartalmaz kalcium puffert, úgy az $I_{Ca,L}$ mérését biztonságosabb az ionáram sorozat végére időzíteni.

6.3. Áramprofilok az AP alatt – faji és regionális eltérések

Ebben a szakaszban a munkába bevont ionáramok AP alatti profiljának meghatározása során kapott eredmények bemutatása történik áramtípusonként, fajok szerinti bontásban. Az esetlegesen megfigyelt szíven belüli regionális különbségek megbeszélése fajokon belül történik.

6.3.1. L-típusú kalcium áram ($I_{Ca,L}$)

A kísérletekben 1 μ M Nisoldipint (Bayer, Leverkusen) használtunk gátlószerként. A seal létrehozását követően Current Clamp módban felvettük a sejt saját AP-ját és ezt az AP-t használtuk parancsjelként a kísérletekben. Idegen AP-t kizárólag abban az esetben használtunk parancsjelként, ha a tudományos probléma ezt szükségessé tette (pl. a regionális különbségek vizsgálatakor).

6.3.1.1. Az $I_{Ca,L}$ profilja kutya kamrai szívizomsejtekben

A kamrai szívizomzat endocardialis részéből származó (ENDO) sejtek áramgörbéi az AP felszálló szárával egyidőben meredeken növekedtek, majd éles csúcsot adva néhány ms-on belül gyorsan csökkentek (6. ábra). Az áram lecsengésének sebessége a hagyományos négyszög alakú parancsjeleket használó VC mérések során megfigyelhetőnél lényegesen gyorsabb volt, amelynek oka valószínűleg az AP első fázisában lezajló gyors repolarizáció lehetett. EPI sejtek esetében az áram csúcsának átlaga az ENDO sejtekében megfigyeltekénél szignifikánsan kisebb volt (ENDO: -4.6 ± 0.8 A/F, EPI: -2.8 ± 0.3 A/F). A két sejttípus áramprofilja közötti legjelentősebb különbség azonban az volt, hogy EPI sejteken az AP csúcsa és a dóm között kialakult egy második csúcs. Ez a második csúcs az első csúcsnál alacsonyabb és szélesebb volt, lecsengése pedig az ENDO sejtekben látott áramcsökkenésnél jóval lassabb. Míg ENDO sejtekben az AP csúcsa után 100 ms-al az áram lényegében már teljesen lezajlott, EPI sejteken az áram az AP teljes hosszában, csökkenő jelleggel bár, de megfigyelhető volt. Az áramprofilok ilyen jelentős különbsége valószínűleg kapcsolatban állhat az ENDO-EPI sejtek AP-jának igen különböző feszültségprofiljával. Amint az jól ismert, kutya (ahogy emberben is), a kamrai szívizomsejtek AP-jének alakjában ENDO-EPI irányban jelentős különbséget figyelhetünk meg (transmural inhomogeneity). Az ENDO sejtek AP-ján plató fázis látható (plateau configuration). Ezzel szemben EPI sejteken a korai repolarizációt egy újabb, lassú depolarizáció követi, amely úgynevezett dómot hoz létre (spike and dome configuration). Az áram-feszültség karakterisztikán jól látható, hogy ENDO sejt esetében az egyszerű áramhurok csak egy viszonylag szűk feszültségtartományra korlátozódik. Ezzel szemben EPI sejteken egyrészt az áramhurok jóval szélesebb feszültségtartományra terjed ki, másrészt az áram két csúcsa miatt dupla hurkot figyelhetünk meg. A két sejttípusban megfigyelhető, alapvetően eltérő áramprofilokat látva felvetődik a kérdés, hogy a különbség az ioncsatornák kapuzási sajátságainak, vagy az AP profiljában látható különbségek következménye-e? A kérdés megválaszolásának legegyszerűbb módja, ha megvizsgáljuk, hogy mi történik, ha ENDO sejten EPI AP, vagy EPI sejten ENDO AP parancsjelet alkalmazunk. Megfigyeléseink szerint az áramprofil és az AP feszültségprofilja szorosan összetartoznak. Ha ENDO sejten parancsjelként EPI AP-t alkalmazunk, az $I_{Ca,L}$ profilja az EPI sejteken megfigyeltekének megfelelő lefutást mutat (7. ábra). Ezzel összhangban, ENDO AP-t alkalmazva parancsjelként, EPI sejten pedig ENDO sejtekre jellemző lefutású $I_{Ca,L}$ -t rögzíthetünk. Az $I_{Ca,L}$ profilok közötti különbség oka tehát nem az ENDO és EPI régiókban található ioncsatornák eltérő kapuzási sajátságaiban keresendő; valószínűsíthető, hogy a két régióban ugyanaz az L-típusú kalcium csatorna található értelemszerűen azonos kinetikai jellemzőkkel. Ennek bizonyítására összehasonlítottuk az $I_{Ca,L}$ jellemzőit hagyományos,

7. ábra. Az akciós potenciál alakjának hatása az $I_{Ca,L}$ profiljára

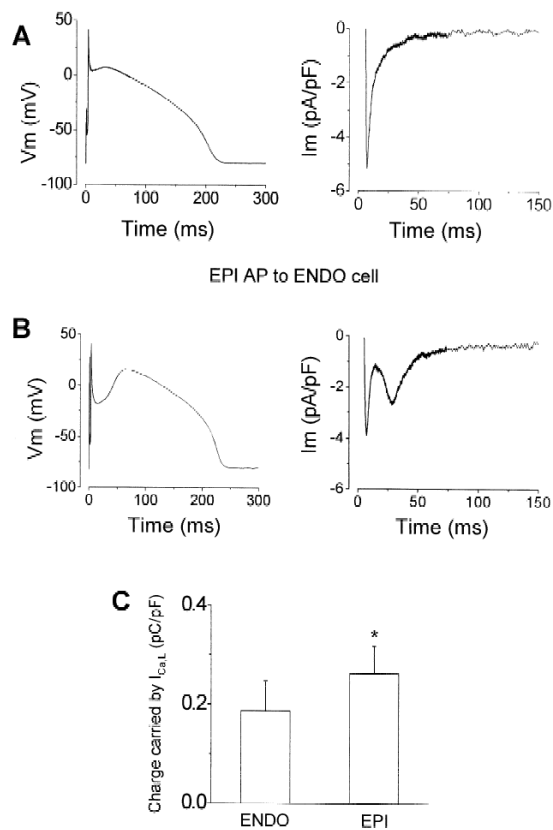
A panel: Epicardialis (EPI) eredetű sejtben endocardialis (ENDO) AP-t alkalmazva parancsjelként az $I_{Ca,L}$ lefutása ENDO sejtekéhez hasonló lesz.

B panel: ENDO sejtben alkalmazva EPI AP-t az EPI sejtekre jellemző kétszcúszú $I_{Ca,L}$ látható.

Az A és B paneleken látható reprezentatív AP és áramgörbe párok bizonyítják, hogy az áramprofil nem a sejt eredete, hanem az AP alakja határozza meg. Hasonló megfigyelést tettünk további 5-5 ENDO és EPI sejten.

C panel: Az AP alatt az $I_{Ca,L}$ -on keresztül elmozduló töltés mennyisége EPI sejteken szignifikánsan több, mint az ENDO sejteken.

$n=5$, $p<0.05$



négyszög alakú parancsjelet alkalmazó VC módszerrel. Elemzéseink során az ENDO és EPI régióban található $I_{Ca,L}$ feszültségfüggésében és kinetikai paramétereiben szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Ezzel bizonyítottunk tekinthetjük, hogy a szív általunk vizsgált két régiójában ugyanaz a csatorna felelős a különböző lefutású áramprofilok létrehozásáért. A csatorna azonossága ellenére az áramprofil különbözőségéből eredően az EPI sejtekbe egy AP alatt belépő Ca^{2+} mennyisége szignifikánsan nagyobb az ENDO sejtekbe belépőnél (EPI: 0.262 ± 0.056 C/F, ENDO: 0.187 ± 0.059 C/F).

A megfigyelések további tesztelése céljából számítógépes szimulációt végeztünk. A szimulációhoz a Luo-Rudy modellt használtuk Kass-Sanguinetti féle inaktivációs kinetikával [3]. A modellt VC üzemmódban futtattuk és azt vizsgáltuk, hogy az ENDO és EPI AP parancsjelek hatására milyen az $I_{Ca,L}$ lefutása. A szimuláció során a modell valamennyi paramétere az eredeti, publikált érték volt, kivéve a csatorna egységnyi vezető képességét, amelyet a jobb illeszkedés elérése céljából optimalizálnunk kellett. A szimulációs kísérletek eredményei teljes egyezést mutattak kísérleti megfigyeléseinkkel. A Luo-Rudy modell megbízhatóan reprodukálta az általunk regisztrált ENDO és EPI típusú $I_{Ca,L}$ görbéket. Az AP alatti lefutáson túlmenően, a szimulált áramgörbék sikeresen reprodukálták az ENDO sejteken megfigyelhető szimpla, illetve az EPI sejteken megfigyelhető dupla áramhurkokat. A szimulációs kísérletek újabb,

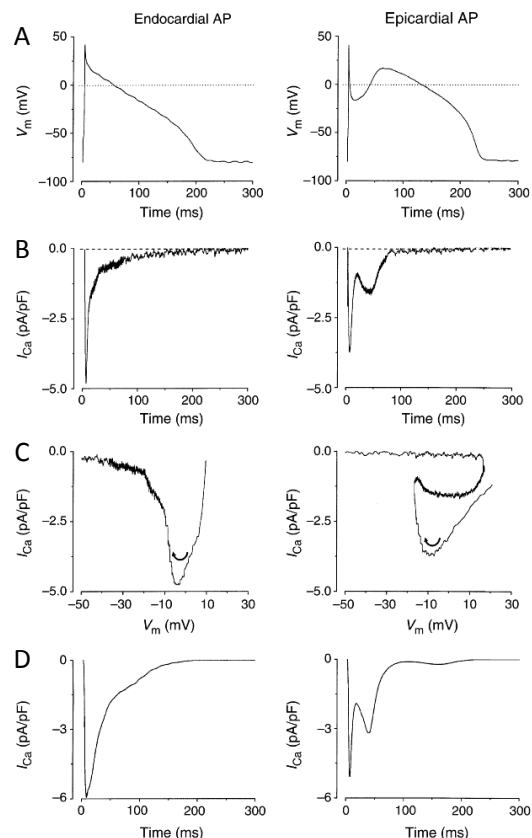
8. ábra. Endocardialis (ENDO) és epicardialis (EPI) akciós potenciálok (AP) alkalmazásával nyert $I_{Ca,L}$ áramjelek humán kamrai szívműködéseken

A panel: A parancsjelként alkalmazott kutya ENDO és EPI AP-k.

B panel: Humán kamrai sejteken rögzített reprezentatív áramjelek ENDO (bal oldali) és EPI (jobb oldali) AP alkalmazásával. Hasonló eredményeket kaptunk további hét sejten.

C panel: Az A és B paneleken látható AP és áramjelekből származó áram-feszültség görbék. Jól elkülöníthető az ENDO és EPI sejtekre jellemző egyhurkú és kéthurkú profil.

D panel: Az $I_{Ca,L}$ görbék számítógépes rekonstrukciója ENDO és EPI AP-k felhasználásával.



független módon igazolták tehát azt a kísérleti adatokból levont következtetésünket, hogy ugyanaz a kalcium csatorna az AP feszültségprofiljától függően az ENDO és EPI sejtekben eltérő lefutású $I_{Ca,L}$ -t hoz létre.

Az $I_{Ca,L}$ apico-basalis, vagy epicardialis-mid miocardialis irányú összehasonlítása nem mutatott ki szignifikáns különbséget sem az áram nagysága, sem annak kinetikai paraméterei között.

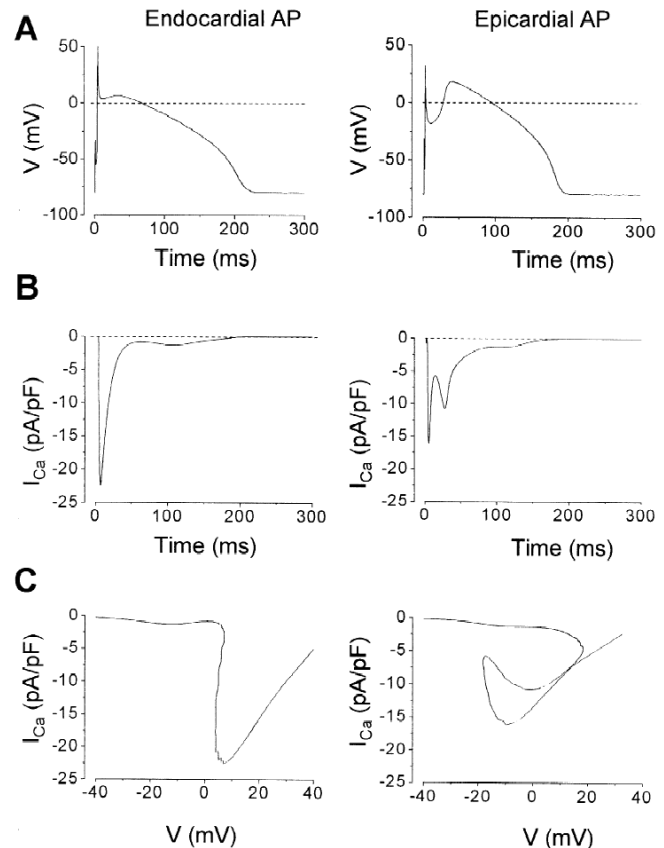
6.3.1.2. Az $I_{Ca,L}$ profilja human kamrai szívműködéseken

Az előző pontban kapott megfigyelések relevanciáját, illetve emberi szívműködésre történő alkalmazhatóságát humán balkamrai szívműködéseken teszteltük APC módszerrel. Az eredmények jobb összevethetősége érdekében az emberi izolált szívműködéseken az AP Clamp kísérletekhez a kutya kísérletekben rögzített AP-eket használtuk parancsjelként, ugyanis az emberi szívműködéseken az AP második fázisát követő incizúra kevésbé kifejezett. A várható különbségek felerősítése érdekében a korábban rögzített AP-jeink közül két olyat választottunk ki, amelyen az ENDO-EPI különbségek igen határozottan megfigyelhetők voltak. Az $I_{Ca,L}$ mérése Nisoldipine érzékeny áramként történt.

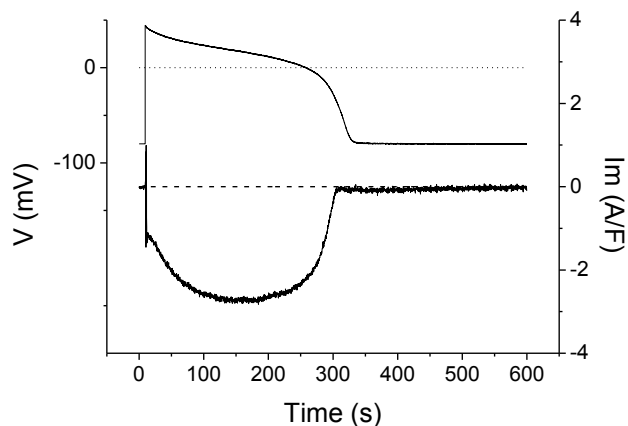
9. ábra. Az $I_{Ca,L}$ számítógépes rekonstrukciója endokardialis és epikardialis konfigurációjú akciós potenciálok (AP) esetén

Az ábrán a Luo-Rudy féle matematikai model alapján a Kass-Sanguinetti inaktivációs kinetika alkalmazásával számított $I_{Ca,L}$ profilok láthatóak. A modell sikeresen rekonstruálja az endokardialis és epikardialis sejtekben megfigyelt áramok lefutásait és az áram-feszültség görbéken is felismerhető a kísérletekben megfigyelt szimpla, valamint dupla hurok.

A modell alkalmazásához saját méréseink során rögzített AP-kat használtunk.



A humán kamrai szívizomsejteken ENDO és EPI AP segítségével kapott áramgörbék nagy hasonlóságot mutattak a kutyán megfigyelt görbékkel (8. ábra). Az AP felszálló szárát követően az áram gyorsan elérte csúcsát, majd meredeken csökkenni kezdett. ENDO AP esetében a csökkenés exponenciális jelleggel folytatódott és az áram az AP végére lecsengett. EPI AP esetében az incisurát követő dóm felszálló szárával egyidőben egy második csúcs jelentkezett, mely szélesebb és laposabb volt a megelőző csúcstól. Ezt követően az áram az ENDO konfigurációhoz hasonlóan gyorsan nullára csökkent. Az áram-feszültség diagramm a kutya sejteken megfigyeltékhez hasonlóan egy hurkot képezett az ENDO és két hurkot az EPI AP esetén. Humán sejteken azonban az ENDO típusú hurok jóval keskenyebb volt, mint a kutya sejteken látható. Ennek oka valószínűleg a humán szívizomsejtek ioncsatornáinak kutyától való eltérő kapuzási kinetikája lehet. A Luo-Rudy modell alkalmazásával a Kass-Sanguinetti inaktivációs kinetikát használva rekonstruáltuk az $I_{Ca,L}$ AP alatti lefutását (9. ábra). Mivel a modell az eredeti paramétereivel az áramcsúcsot jelentősen túlbecsülte, a jobb illeszkedés kedvéért a csatorna egységnyi vezető képességét csökkentenünk kellett. Ezen módosítás után a modell igen jól reprodukálta a kísérletekben látott ENDO és EPI típusú áramprofilokat.



10. ábra. Az $I_{Ca,L}$ lefutása tengeri malac kamrai szívizomsejten

Reprezentatív akciós potenciál és $I_{Ca,L}$ áramprofilok tengeri malac kamrai szívizomsejtjéből. Az $I_{Ca,L}$ egy gyors felszálló szárát követően széles, lapos dómot formál, majd az akciós potenciál harmadik fázisa alatt az áram meredeken csökken és a teljes repolarizációt megelőzően értéke eléri a nulla vonalat.

Hasonló megfigyeléseket tettünk 14 további kamrai szívizomsejten.

Kísérleteink megmutatták, hogy az $I_{Ca,L}$ áramprofiljának ENDO-EPI irányú inhomogenitása emberi szívizomban is jelen van.

6.3.1.3. Az $I_{Ca,L}$ profilja tengeri malac kamrai szívizomsejteken

A tengerimalac kamrai szívizom sejtjein az $I_{Ca,L}$ kiterjed az AP teljes hosszára eltérően a korábban tárgyalt kutya és humán sejteken megfigyeltektől (10. ábra). Bár az AP felszálló szárát követően az áram itt is gyorsan aktiválódik, de a gyors fázist egy további, lassabb növekedés követi. Az áram a plató alatt lapos csúcsot képez, majd előbb lassan, később egyre gyorsuló ütemben csökkenve az AP teljes lezajlása előtt szűnik meg. A tengeri malacok szívizomsejtjeiből hiányzik az I_{to} , emiatt az AP morfológiájában kutya és humán sejteken ismert ENDO-EPI irányú inhomogenitás itt nem figyelhető meg.

Bár az AP alakja és az egyes ionáramok lefutása közötti kapcsolat elemeit még sok tekintetben nem ismerjük, az elmúlt évek kutatásainak eredményeként egyre több részlet kerül tisztázásra. Már a legkorábbi vizsgálatok, hagyományos VC technika alkalmazásával megmutatták, hogy az AP első fázisa során a gyors repolarizáció fokozza a Ca^{2+} ionokra ható hajtóerőt és ezzel hozzájárul az $I_{Ca,L}$ fenntartásához a plato alatt. Ezt a megállapítást APC technika alkalmazásával többen is megerősítették

11. ábra. Az I_{to} akciós potenciál (AP) alatti alakja kutya kamrai epicardialis sejteken

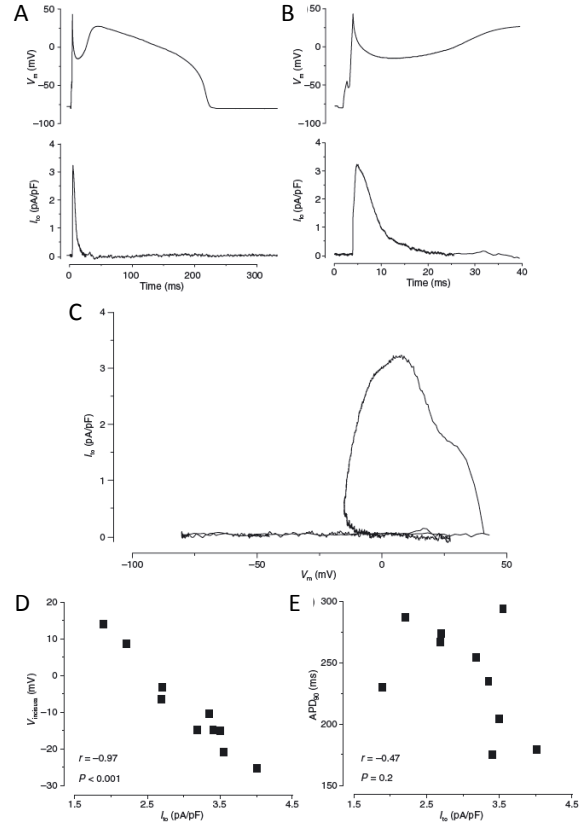
A panel: reprezentatív AP és I_{to} alakok

B panel: Az A panelen látható AP és áramjelek első 40 ms-os szakasza

C panel: A reprezentatív AP és áramjelből szerkesztett áram-feszültség diagramm. Megfigyelhető, hogy az I_{to} csupán az AP erősen depolarizált szakaszán aktív.

D panel: Erős korreláció figyelhető meg az AP incizurájának mélypontján mért feszültségérték és az I_{to} nagysága között.

E panel: Nincs korreláció az I_{to} erőssége és az AP hossza között.



nyúlon [12, 107] és tengeri malacon, mely utóbbi fajon a plato alatti fenntartott komponenst is megfigyelték [13, 108]. A kísérleti megfigyelésekkel ellentétben a hagyományos Luo-Rudy modell nem jósol jelentős fenntartott komponenst a plato alatt, ezzel szemben az AP harmadik fázisa során újabb áramnövekedéssel, egyfajta késői csúccsal számolnak a hajtóerő további növekedése miatt [3]. Ennek a modellnek teljes mértékben megfelel a kutya és emberi kamrasejteken rögzített $I_{Ca,L}$ alakja és ezeken a fajokon a modell jól jósolja az ENDO-EPI heterogenitást is. A tengeri malac kamrai izomsejtjeiben mérhető AP alakja jelentősen eltér a kutya és az ember szívizomsejtjeiben megfigyelhetőkéitől. Sokkal jobban hasonlít egy szabályos négyszög alakú parancsjelhez, mint a másik két faj AP-ja. Annak megértése azonban, hogy az $I_{Ca,L}$ alakjában tapasztalható jelentős különbségek mennyiben tulajdoníthatóak a feszültségprofilon látható különbségeknek és mennyiben vezethetőek vissza csatornák feszültségérzékenységében vagy kapuzási tulajdonságaiban megmutatható különbségekre, további kutatásokat tesz szükségessé.

12. ábra. Az I_{K1} akciós potenciál (AP) alatti alakja kutya kamrai szívizomsejteken

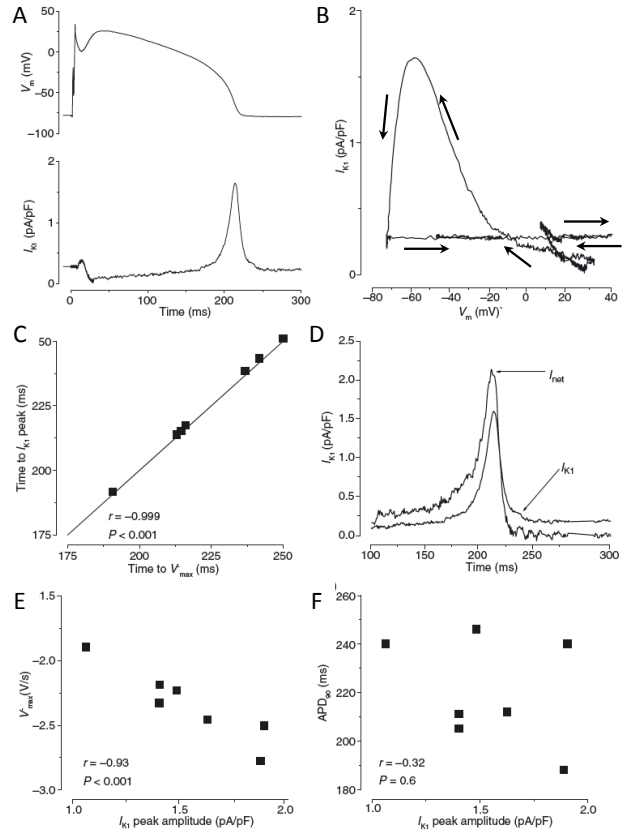
A panel: reprezentatív AP és I_{K1} alakok

B panel: A reprezentatív AP és áramjelből szerkesztett áram-feszültség diagramm. Megfigyelhető, hogy az I_{K1} a teljes feszültségtartományban jelen van, de -20 mV feletti membránpotenciál értékeknél nagysága a diastoles szint alá csökken.

C panel: Az I_{K1} csúcsa nagyfokú időbeli egybeesést mutat az AP harmadik fázisának maximális repolarizációjával.

D panel: Az AP alakjából és a sejt kapacitásából számított nettó áram és az I_{K1} viszonya a terminális repolarizáció során. Míg a plató alatt az I_{K1} kevesebb mint a felét adja a nettó áramnak, a terminális repolarizáció során részesedése már meghaladja a nettó áram 75%-át.

E és F panelek: Nincs korreláció az I_{K1} erőssége és az AP terminális repolarizációjának maximális sebessége, vagy a hossza között.



6.3.2. Kálium áramok

Az kálium áramok több típusa játszik fontos szerepet a szív akciós potenciáljának megformálásában és bár ezek expressziója, nagysága jelentősen különbözik az egyes fajokon, tapasztalataink szerint az AP alatti profilok fajok közötti variabilitása viszonylag kicsi. Ezért ebben a szakaszban kizárólag kutya kamrai szívizomsejteken kapott eredmények bemutatására szorítkozom.

6.3.2.1. A Tranziens Outward Kálium áram (I_{to})

Az I_{to} méréséhez 1 mM koncentrációjú 4-aminopyridint használtunk, ami ugyan csak 70%-os gátlást fejt ki a csatornán, viszont a többi kálium áramot még nem gátolja jelentős mértékben. 1 Hz-es ingerlési frekvencián mérve az I_{to} az AP felszálló szárát követően igen gyorsan aktiválódik, a csúcserőértékét 4.4 ± 0.7 ms alatt elérve (11. ábra). Ezt követően az áram monoexponenciális jelleggel csökken, időkonstansának átlagértéke 7.4 ± 0.6 ms-nak adódott. 50 ms-al az AP csúcsa után az áram már nem különíthető el az alaponaltól. Az áram csúcserőértéke 3.0 ± 0.23 A/F, integrálja 29.7 ± 2.5 fC6pF volt ($n=10$). Az áram

13. ábra. Az I_{Kr} akciós potenciál (AP) alatti alakja kutya kamrai szívműködéseken

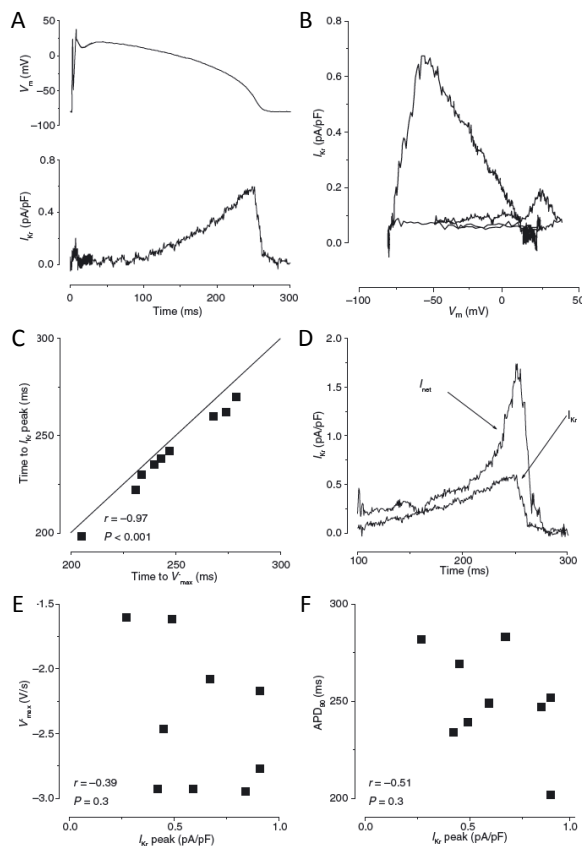
A panel: reprezentatív AP és I_{Kr} alakok

B panel: A reprezentatív AP és áramjelből szerkesztett áram-feszültség diagramm. Megfigyelhető, hogy az I_{Kr} az AP csaknem teljes feszültség tartományában aktív.

C panel: Az I_{Kr} csúcsa nagyfokú időbeli egybeesést mutat az AP harmadik fázisának maximális repolarizációjával.

D panel: Az AP alakjából és a sejt kapacitásából számított nettó áram és az I_{Kr} viszonya. Míg a plató alatt az I_{Kr} adja a nettó áram nagy részét, a terminális repolarizáció során részese csökken, mint a nettó áram fele.

E és F panelek: Nincs korreláció az I_{Kr} erőssége és az AP terminális repolarizációjának maximális sebessége, vagy a hossza között.



csúcsértéke mindig megelőzte az AP incisuráját és annak felszálló szárát 10.0 ± 0.8 ms-al követte. Az áram-feszültség görbén látható, hogy az I_{to} a -15 és +40 mV-os tartományban aktív, a csúcsértékét 8.8 ± 1.9 mV értéknél éri el. Nagyfokú lineáris korreláció volt megfigyelhető az egyes sejteken mért áramcsúcs nagysága és az AP incisurájának mélysége között. Ha az incisura legalacsonyabb pontján mért feszültséget ábrázoltuk az I_{to} csúcsértékének függvényében, a korrelációs koefficiens értéke -0.97-nek adódott, ami igen erős korrelációt jelez ($p < 0.001$). Kutyan jó ideje ismert az I_{to} EPI-ENDO irányú inhomogenitása: EPI sejteken, ahol az AP mély incisurával rendelkezik, az I_{to} átlagos áramsűrűsége jelentősen meghaladja az ENDO sejteken mértet, amelyek incisurája kevésbé kifejezett vagy éppen hiányozhat is [31, 109]. Ezek a megfigyelések már jelezték, hogy az AP incisura és az I_{to} kapcsolatban állnak egymással. Itt bemutatott kísérleteink első alkalommal elemzik az incisura és a sejt saját AP-ja alatt mért I_{to} viszonyát, először sikerül kimutatni a két paraméter közötti statisztikailag erős összefüggést. Szemben az incisura alakjával, az akciós potenciál hossza (APD_{90}) és az I_{to} csúcsértéke között nem tudtunk korrelációt kimutatni, ami arra utal, hogy kutya esetében az AP hosszának meghatározásában az I_{to} nem játszik jelentős szerepet.

6.3.2.2. A befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1})

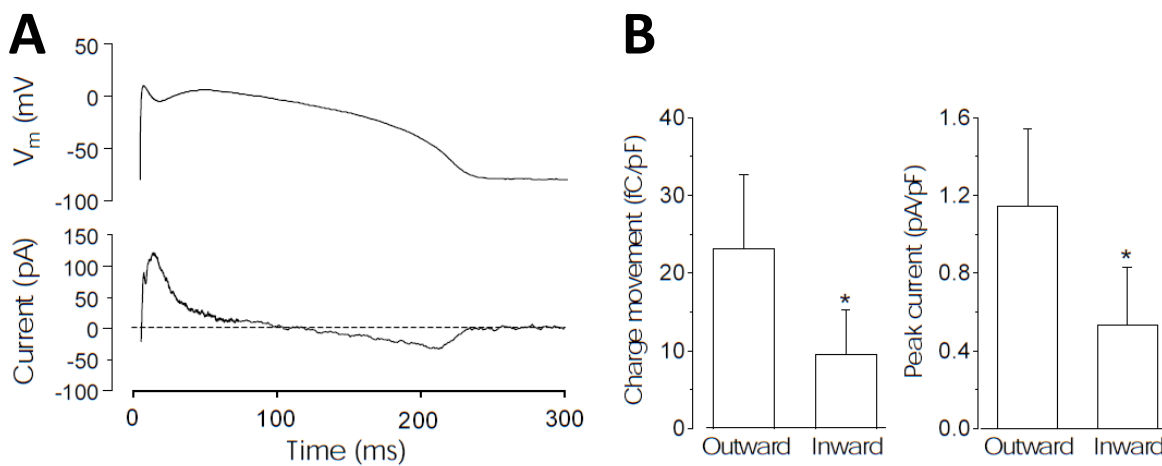
A befelé egyenirányító áram AP alatti lefutását 50 μ M BaCl segítségével vizsgáltuk, amely -58 mV-nál mérve az I_{K1} mintegy 88%-át gátolja, de elhanyagolható hatást fejt ki a többi áramra [110]. Szemben a többi K^+ árammal az I_{K1} a diastole alatt egy állandó pozitív (outward) értéket mutat, amely átlagértéke 0.26 ± 0.03 A/F ($n=7$). Az AP felszálló szárával egyidőben az áram meredeken csökkent, majd a plató alatt lassú monoton növekedést mutatott (12. ábra). Az AP hosszának felénél az áram nagysága 0.13 ± 0.03 A/F volt, amely még mindig csupán fele a diastole alatt mérhető értéknek. Az AP harmadik fázisa alatt - 22.4 ± 0.8 A/F értéknél az áram növekedése felgyorsult és csúcsértékét (1.8 ± 0.1 A/F) a V_{max} után 1 ms-al követően érte el 58.3 ± 0.6 mV feszültségnél. Az I_{K1} integrál értéke 61.6 ± 6.2 fC/ pF volt, amelyből 41.6 ± 2.7 fC/pF esett a terminális repolarizációra és 19.9 ± 6.0 fC/pF a plato időtartamára. Az I_{K1} szolgáltatotta az I_{net} 75%-át a V_{max} időpontjában, ennek megfelelően az AP harmadik fázisa alatti maximális repolarizáció időpontja és nagysága erős korrelációt mutatott az I_{K1} csúcs időpontjával és nagyságával. Hasonlóan az I_{to} és I_{Kr} esetében megfigyeltekhez, nem találtunk korrelációt az áramcsúcs amplitúdója és az AP hossza (APD_{90}) között.

Az I_{K1} a kamrai szívműködés nyugalmi membránpotenciáljának fenntartásában és a terminális repolarizációban résztvevő legjelentősebb kálium áram. Az I_{K1} általunk megfigyelt profilja jó egyezést mutat a Zaza és *mtsai* által tengeri malacban leírt áramprofillal, bár méréseink szerint kutyaiban nagysága a tengeri malacétól elmarad [111]. Méréseink megmutatták, hogy az áram a diastole alatt folyamatosan jelen van, az akciós potenciál platója alatti csökkenése a csatorna depolarizáció hatására fokozódó egyenirányító hatásával magyarázható [112]. A terminális repolarizáció alatti gyors növekedése jól magyarázható egy olyan pozitív visszacsatolással, amely a csökkenő membránpotenciál miatt megszűnő egyenirányítás és a kiépülő áram által szolgáltatott fokozódó repolarizáló erő között jön létre.

6.3.2.3. A késői egyenirányító áram gyors komponense (I_{Kr})

A késői egyenirányító áram gyors komponensét 1 μ M E-4031 segítségével mértük. Ebben a koncentrációban alkalmazva a szer nagyfokú szelektivitást mutat és nem ismert, hogy más ioncsatornákkal kölcsönhatásba kerülne. Az AP Clamp kísérletekben az I_{Kr} monoton módon emelkedett az AP harmadik fázisa alatt látható csúcsig, majd ezt követően a nyugalmi membránpotenciál eléréséig meredeken csökkent (13. ábra). Az áramcsúcs átlagos amplitúdója 0.62 ± 0.08 A/F, az integrál értéke

57.6±6.7 fC/pF volt (n=9), ami jó egyezést mutat más szerzők egyéb módszerekkel kapott eredményeivel [113]. Az AP hosszának felénél az áram nagysága mindössze 0.14±0.03 A/F, ami az amplitúdó 23.1±4.6%-a és lassú, késleltetett kezdeti növekedésre utal. Az áram növekedése +17±3.5 mV értéknél gyorsul fel és a csúcsát -54.2±1.7 mV-nál éri el. Az áram-feszültség görbe megmutatja, hogy az áram -75 és +15 mV tartományban aktív. Elemzéseink megmutatták, hogy az I_{Kr} csúcsa 5-10 millisecundummal megelőzi a harmadik fázis maximális repolarizációjának időpontját. A két időpont közötti szoros, lineáris korreláció ($r=0.97$, $p<0.001$) arra utal, hogy az áram jelentős szerepet tölt be a terminális repolarizációban. Az I_{Kr} repolarizációhoz való hozzájárulásának mennyiségi viszonyait a nettó membránárammal való összehasonlítással becsültük meg. A nettó membránáram definíció szerint az az áramgörbe, ami adott sejtkapacitás esetén létrehoz egy adott AP-t. Ismert AP esetén a nettó áram (I_{net}) az $I_{net} = -C_m \cdot dV/dt$ képlettel számítható. Az összehasonlító elemzések megmutatták, hogy a plato nagy része alatt az I_{Kr} a domináns áram, amely az I_{net} több mint 80%-át teszi ki. A harmadik fázis során azonban a felgyorsuló repolarizációhoz az I_{Kr} már csupán az I_{net} kevesebb, mint egyharmadával járul hozzá. Valószínűleg ennek a kismértékű hozzájárulásnak tulajdonítható, hogy az I_{Kr} csúcsának amplitúdója nem mutatott korrelációt sem a terminális repolarizáció maximális értékével (V_{max}), sem az AP hosszával (APD_{90}).



14. ábra. Az I_{Cl} profilja az akciós potenciál alatt

A: Az I_{Cl} -t ANTRA érzékeny áramként meghatározva az áram egy korai outward és egy késői inward komponensből áll 0 mV körüli egyensúlyi potenciál értékkel.

B: Az outward komponens során elmozduló töltés mennyiség és az áram csúcsértéke közel duplája az inward komponensének.

6.3.3. A klorid áram AP alatti profilja kutya kamrai szívizomsejteken

A Klorid áram (I_{Cl}) AP alatti profiljának meghatározására az antracén-9-karboxilsav (ANTRA) érzékeny áramot használtuk. A kísérleteket 37 °C-on végeztük, az ANTRA-t a csatorna blokkolására 0.5 mM koncentrációban alkalmaztuk két percen át. Az előkísérletek szerint ez az időtartam elég volt a kompenzáló áram stabilizálódásához.

Az I_{Cl} kétfázisú áramként jelen volt az AP teljes hossza alatt (14. ábra). Az AP felszálló szára alatt az outward komponens gyorsan kiépült és az incizúra mélypontjának elérése előtt elérte csúcsát, majd csökkenni kezdett. A csökkenés kezdetben viszonylag gyorsan zajlott, az áram nagysága 30-40 ms-on belül a csúcsérték mintegy harmadára esett. Ezt követően az áram az egész plato alatt közel lineáris módon csökkent a plato középső szakaszán 0 mV érték körül irányt váltva. Az AP harmadik fázisában az áram inward csúcsot adott, majd a repolarizáció lezajlásával egyidőben nagysága nullára csökkent. Az I_{Cl} outward fázisa alatt mind a csúcs értéke, mind az áram integrálja nagyobb volt az inward fázisban megfigyelhetőnél.

6.4. A kamrai szívmemóriák membránáramainak koordinációja

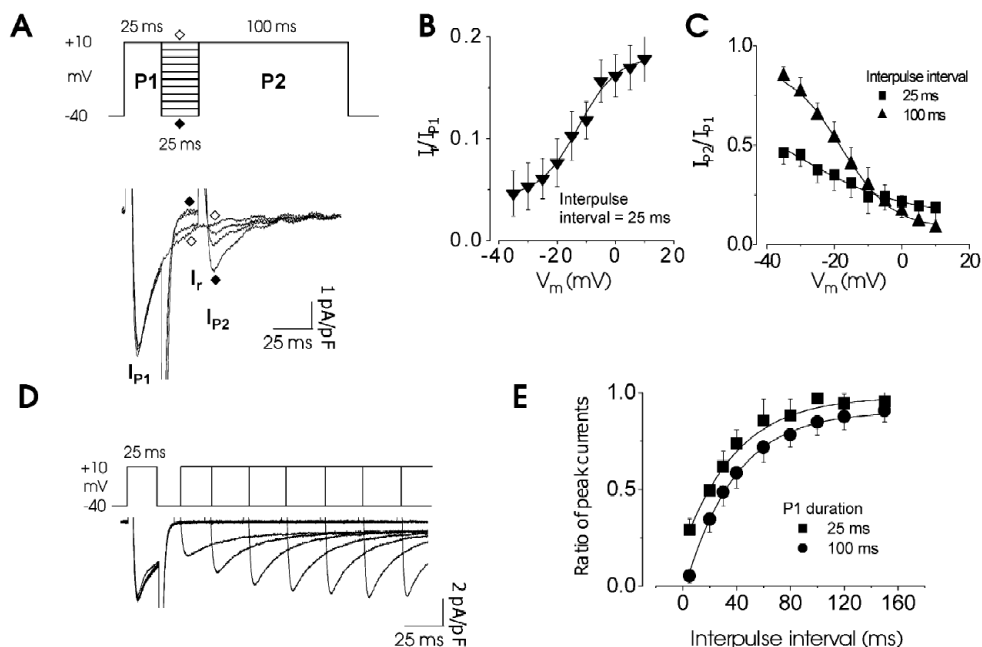
Az AP jellegzetes feszültségprofilját a sejtmembrán ionáramainak finom egyensúlya, a depolarizáló és repolarizáló erők pillanatnyi eredője rajzolja meg. Minthogy az egyes ioncsatornák funkcionális állapotai (aktiváció, deaktiváció, inaktiváció, inaktivációból való visszatérés) közötti átmenet egyik legfontosabb meghatározója a mindenkori membránpotenciál értéke, a feszültségprofil visszahat az őt kialakító ionáramok dinamikájára. Az egyes ionáramok tehát a feszültségprofil alakításán keresztül saját AP alatti lefutásukat is befolyásolják, aktivációjukat és inaktivációjukat koordinálják. A szívmemóriák egyes ionáramainak erőssége között jelentős különbségek vannak, ezért hozzájárulásuk a membránpotenciál változásához is különböző lesz. Így módon az egyes erősebb ionáramok mintegy „vezetik” a gyengébb ionáramok kiépülését, vagy lecsengését, ami az individuális áramok membránpotenciálon át történő koordinációjának felel meg. A következő szakaszokban a membránpotenciál és az egyes ionáramok, illetve az egyes ionáramok közötti koordináció tanulmányozása során kapott eredményeink bemutatása következik.

6.4.1. Az akciós potenciál és az ionáramok koordinációja

Ebben a szakaszban az AP feszültségprofilja és az ionáramok közötti kapcsolatot elemzem .

6.4.1.1. Az $I_{Ca,L}$ és az AP koordinációja

Az általunk tanulmányozott fajokban a kamrai szívmemóriák AP-je hosszú plato fázissal, vagy dómmal rendelkezik és ezért első közelítésben csak kevésbé különbözik a hagyományos VC technikákban használt négyszög alakú parancsjelektől. Ennek ellenére az $I_{Ca,L}$ profilja az AP alatt jelentősen különbözik a négyszög alakú parancsjelek alkalmazása során rögzített áramprofiltól. A következő vizsgálatok célja az volt, hogy megtudjuk, milyen visszacsatolási mechanizmusok működnek az AP feszültségprofilja és az $I_{Ca,L}$ dinamikája között.



15. ábra. A depolarizációt megszakító repolarizációs lépcső deaktiválja az L-típusú kalcium csatornákat és lehetőséget ad azok újraindítására

A: reprezentatív áramgörbék a depolarizáló parancsjelet megszakító repolarizáló lépcsőkkel.

B: A repolarizáló lépcső végén mért áram nagysága a negatív potenciál értékek felé csökken.

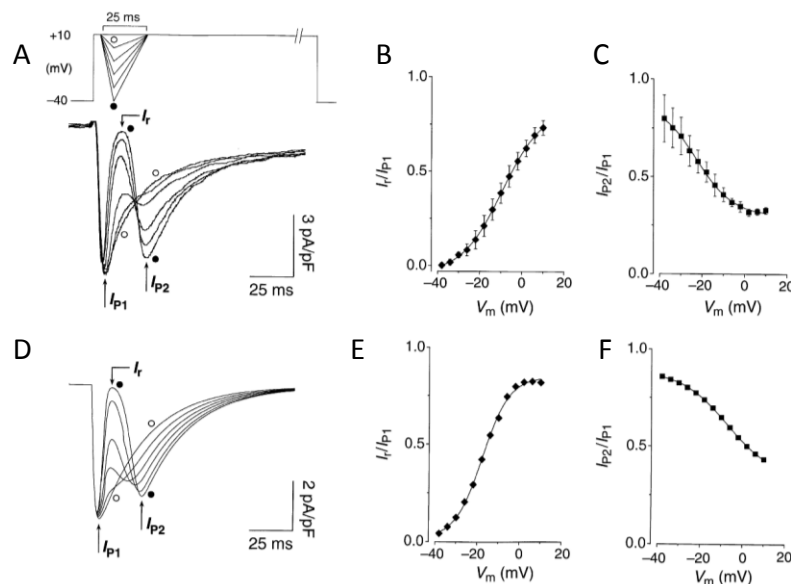
C: A szélesebb és mélyebb repolarizáló lépcsők megnövelik a második áramcsúcs nagyságát.

D: Az első depolarizáló lépcső szélessége nincs jelentős hatással az $I_{Ca,L}$ inaktivációból való visszatérésére

Kutyaszíven végzett vizsgálatok

Ezek a megfigyelések egyértelműen mutatják, hogy kutya EPI sejtekben a dómot az $I_{Ca,L}$ második csúcsa, vagyis reaktiválódása hozza létre.

Az $I_{Ca,L}$ második csúcsa EPI sejteken a csatornák újra aktiválódásának következményeként jöhet csak létre, hiszen a dóm felszálló szára alatt a membrán depolarizációja miatt a kalcium ionokra ható hajtóerő folyamatosan csökken. Ha a csökkenő hajtóerő ellenére második csúcs alakul ki, az arra utal, hogy a második aktivációban a csatornapopuláció jelentős hányada vesz részt. A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az incizúra mélysége vagy szélessége hogyan befolyásolja a másodszorra aktiválódó csatornák részarányát. Hagyományos VC technikával kettős négyszög alakú parancsjeleket alkalmaztunk kutya kamrai szívizomsejteken (15. bra). Az első depolarizáló parancsjelet -40 mV-ról +10 mV-ra depolarizáltuk 25 ms időtartamra. Ez a depolarizáció felelt meg a csatornák első aktivációjának. Ezt követően egy 25 illetve 100 ms széles repolarizáló lépcsőt alkalmaztunk a különböző időtartamú incizúrák szimulálására. A repolarizáló lépcső feszültségét 5 mV-os lépésközökben -40 mV-ig csökkentettük. A repolarizációt követően egy 100 ms hosszú, +10 mV-os depolarizáció következett az $I_{Ca,L}$ újra aktiválása céljából. A két depolarizáló lépcsőnek megfelelően az áramgörbén két áramcsúcsot



16. ábra. Az AP incizúra modellezése kombinált négyszög és rámpa protokollal human kamrai szívizomsejteken.

A: A kombinált protokoll segítségével mért áramjelek feltárják, hogy a repolarizációs rámpa alatt az $I_{Ca,L}$ deaktiválódik (I_r), majd a következő depolarizáció során a rámpa mélységével arányosan nő a második áramcsúcs (I_{p2}).

B-C: Az $I_{Ca,L}$ incizúra alatti deaktivációjának (B) és reaktivációjának (C) feszültségfüggése.

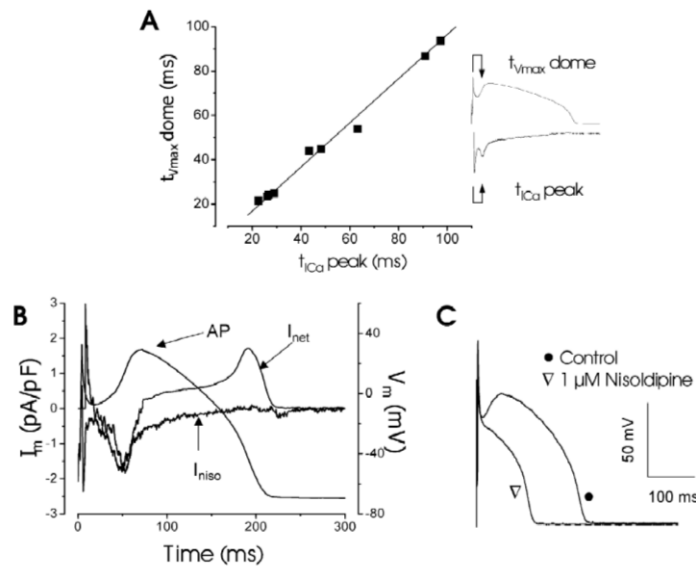
D-F: Az A-C paneleken bemutatott kísérleti eredményeket a Luo-Rudy modell jól rekonstruálja.

láthattunk. Az adatok elemzése során a második áramcsúcsnak az első csúcsra normált értékével jellemeztük az újra aktiválódó csatornapopuláció nagyságát. Adataink azt mutatták, hogy a repolarizáló lépcső szélességének vagy mélységének növelése egyaránt fokozta a második csúcs nagyságát. Megfigyeltük továbbá, hogy a repolarizáló lépcső mélységének növelése az első áramcsúcs lecsengését felgyorsította. Mivel az inaktiváció a pozitívabb membránpotenciál értékeken gyorsul, a jelenség hátterében valószínűleg a csatornák deaktivációja állhat; a rövid repolarizáció tehát a nyitott állapotú csatornákat nem az inaktiváció irányába mozdítja, hanem visszaviszi zárt állapotba, ahonnan a következő depolarizáló lépcső során ismét megnyílhatnak. Ez a megfigyelés az AP-ra vonatkoztatva azt jelenti, hogy minél mélyebb és minél szélesebb az incizúra, annál nagyobb csatornahányad aktiválódik újra, annál nagyobb lesz a második $I_{Ca,L}$ csúcs. Érdekes módon az első depolarizáló lépcső szélessége nem volt jelentős hatás a második csúcs nagyságára. Ha az $I_{Ca,L}$ inaktivációból való visszatérését határoztuk meg 25 vagy 100 ms széles depolarizációval, az első és a második áramcsúcs aránya nem különbözött egymástól szignifikáns mértékben. Ez arra utal, hogy az első depolarizáló lépcső, illetve *in situ* viszonyok között az AP felszálló szára a zárt állapotú csatornák legnagyobb részét aktiválja.

Humán szíven végzett vizsgálatok

Az EPI AP „spike and dome” konfigurációjának modellezése céljából egy olyan kombinált négyszög-rámpa parancsjel alkalmazásával mértük az $I_{Ca,L}$ deaktivációját és reaktivációját, amelyben a rámpákból képezett 25 ms széles incisurát +10 és -40 mV mélység között változtattuk. A kapott áramjelek megmutatták, hogy minél mélyebb volt az incisura, annál erőteljesebben csökkent az $I_{Ca,L}$ (16. ábra, A panel, I_r). Ez egyértelműen azt igazolja, hogy a gyors repolarizációs rámpa alatt a csatorna deaktivációja olyan nagy ütemben zajlik, hogy a feszültségcsökkenés következtében megnövekvő hajtóerő növekedés következményei sem érvényesülnek (a -40 mV-os mélypontnál az áram már mérhetetlenül lecsökken). A feszültségfüggő deaktiváció nagyságát az incizúra mélypontján mért, az első csúcsra normalizált árammal becsültük meg. Látható, hogy a -40 mV-os feszültséghez tartozó hányados értéke nulla (B panel). Ugyanakkor a -40 mV-hoz tartozó második áramcsúcs már az első csúcsnak több mint 75%-a, jelezve, hogy a rövid incizúra alatt az inaktíválódott csatornák nagyrésze is visszatérhetett zárt állapotba (recovery from inactivation). A Luo-Rudy modell alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy a kísérleti adatokat milyen mértékben igazolják a csatorna ismert kinetikai paraméterei. Amint az a D-F paneleken látható, a kapott kísérleti adataink jól megfelelnek a modell által megjósolt viselkedésnek.

A különböző fajokon AP Clamp technikával mért $I_{Ca,L}$ az AP platója alatt eltérő magasságú, de jól felismerhető fenntartott komponenst mutat. Ez a fenntartott komponens hagyományos, négyszög alakú parancsjeleket alkalmazó voltage clamp kísérletekben sosem jelenik meg. Az ellentmondást többen azzal a magyarázattal próbálták feloldani, hogy egyrészt az AP lassú repolarizációja során megnövekszik a hajtóerő, másrészt az inaktíválódott csatornák egy része visszatér a zárt állapotba [12, 13, 107, 108]. A mi adataink arra utalnak, hogy bár a két előzőekben említett jelenség biztosan hozzájárul valamilyen mértékben az $I_{Ca,L}$ fenntartott komponenséhez, de ezeknél a csatorna deaktivációja valószínűleg sokkal fontosabb tényező.



17. ábra. Az EPI sejtek dómját az $I_{Ca,L}$ hozza létre

A: Korreláció az $I_{Ca,L}$ második csúcsának időpontja és a dóm maximális felszállási meredekségének időpontja között. A regressziós görbe 1-et közelítő meredeksége a két időpont egybeesését mutatja.

B: A dóm felszálló szára alatt az $I_{Ca,L}$ és a membrán nettó áramának görbéje jelentős átfedést mutat.

C: Amennyiben az $I_{Ca,L}$ -t gátoljuk, a dóm eltűnik és az AP jelentősen megrövidül.

Az EPI sejtek dómját az $I_{Ca,L}$ hozza létre

Az előzőekben bemutatott adatok arra szolgáltatnak bizonyítékokat, hogy az AP alakja vezérli az L-típusú kalcium csatornákat. A következőkben arra mutatok be példát, hogy az $I_{Ca,L}$ hogyan hat vissza az AP alakjára.

Amint azt láttuk, az EPI AP incisurája alatt az L-típusú kalcium csatornák jelentős része deaktiválódik. Ez a zárt állapotú populáció azonban jelentős depolarizáló erőt képvisel, ha megnyílik. Amint az AP első fázisa alatt az I_{to} inaktiválódik, megszűnik egy jelentős repolarizáló erő és ezzel tér nyílik az $I_{Ca,L}$ számára, hogy a membránpotenciált megfordítsa. A növekvő feszültség egyre nagyobb számú kalcium csatornát nyit meg, s ez a pozitív visszacsatolás a membránpotenciált visszaviszi az AP csúcsának közelébe. Az AP Clamp kísérletek adatainak elemzése megmutatta, hogy az EPI sejteken megfigyelhető második $I_{Ca,L}$ csúcs kialakulásának ideje erős korrelációt ($r=0.998$, $p<0.02$, $n=8$) mutat a dóm maximális felszállási meredekségének időpontjával (17. ábra A panel). Ez a szoros korreláció felveti, de természetesen még nem bizonyítja az ok-okozati összefüggést. Ha azonban összehasonlítjuk az AP alakjából számított nettó membránáram lefutását az AP Clamp módszerrel mért $I_{Ca,L}$ alakjával, láthatjuk, hogy az incisura alatt a kettő jelentős átfedést mutat, különösen a dóm felszálló szára alatt (B panel). A nettó membránáram

($I_{\text{net}} = -C_m dV/dt$) azt az árammenyiséget jelenti, amely adott kapacitás esetén az AP-t létrehozza [9, 114].

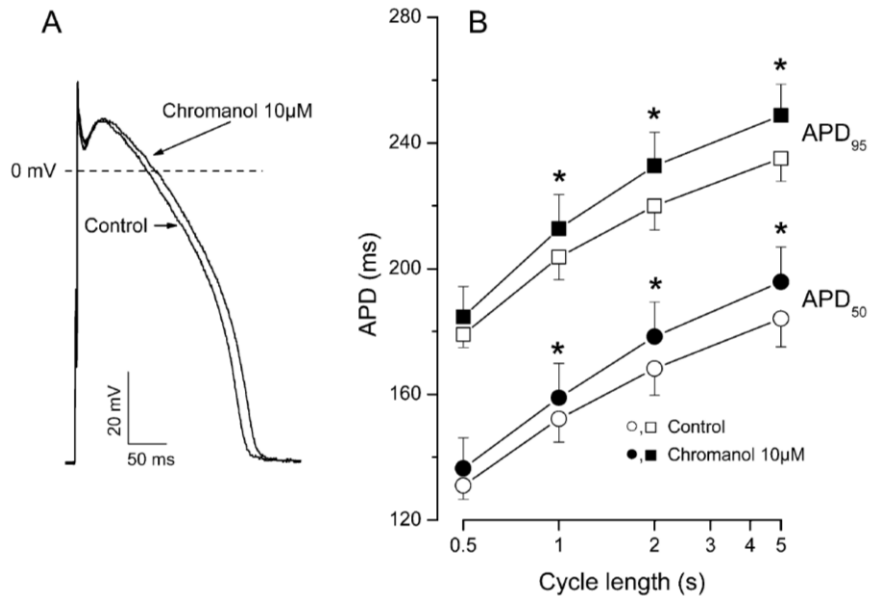
Ez a nagyfokú átfedés azt jelenti, hogy az $I_{\text{Ca,L}}$ második csúcsa nem csak egybeesik a dóm felszálló szárával, de ezen túl a létrehozásához szükséges árammenyiséget is hordozza. Természetesen nem feltételezhetjük, hogy az AP adott szakaszában csak az $I_{\text{Ca,L}}$ van jelen, de az valószínűsíthető, hogy a többi áram közel kinullázza egymást ebben a szakaszban és az $I_{\text{Ca,L}}$ marad a domináns ionáram. A feltevés további bizonyítékaul szolgál, hogy 1 μM Nisoldipin jelenlétében az EPI sejtek dómja eltűnik (C panel).

6.4.1.2. Az AP és az IKs koordinációja

A vizsgálatok első részében arra kerestünk választ, hogy kísérleti körülményeink között a chromanol nyújtja-e a kutya kamrai AP-t. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az AP alakjának farmakonokkal történő módosítása miként befolyásolja az I_{Ks} gátlás által előidézett AP hosszabbodást. Az I_{Ks} gátlására 10 μM Chromanol-293B-t használtunk, amelyet kontroll, illetve 2 nM isoproterenollal, vagy 1 μM E-4031-el előkezelt sejteken teszteltünk. A vizsgálatokat 0.5, 1, 2 és 5 másodperces ingerlési ciklushosszakon végeztük. Az isoproterenol az alkalmazott koncentrációban nem változtatta meg az AP hosszát statisztikailag szignifikáns mértékben, ezzel szemben megemelte a platót. A plató emelés frekvenciafüggő volt, míg 0.5 Hz ingerlési frekvencián az emelkedés mértéke nem volt statisztikailag szignifikáns, 5 Hz-en már több mint 5 mV emelkedést figyelhattunk meg.

A chromanol nyújtja az AP-t

A chromanol kutya kamrai sejteken az AP hosszát frekvenciafüggő módon nyújtotta anélkül, hogy más paraméterekben változás következett volna be. 1 Hz-en történő ingerlés esetén az APD_{50} 152.0 \pm 7.4 ms-ról 158.0 \pm 10.9 ms-ra, az APD_{90} 200.5 \pm 8.2 ms-ról 209.7 \pm 10.8 ms-ra nőtt 10 μM chromanol hatására. Ez a kisfokú, de statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$, $n=6$) nyúlás az ingerlés ciklushosszáinak növelésével egyre jelentősebbé vált (18. ábra). Ugyanakkor a nyugalmi membránpotenciál (-81.0 \pm 2.8 vs -82.7 \pm 2.1 mV), az akciós potenciál amplitúdó (99.4 \pm 2.9 vs 101.2 \pm 3.2 mV), a plató magasság (88.1 \pm 3.3 vs 90.2 \pm 3.5 mV), a felszálló szár maximális meredeksége (272 \pm 23 vs 286 \pm 31 V/s) esetében a 10 μM chromanol nem okozott statisztikailag jelentős változást (az adatok 1 Hz ingerlési frekvenciára vonatkoznak).



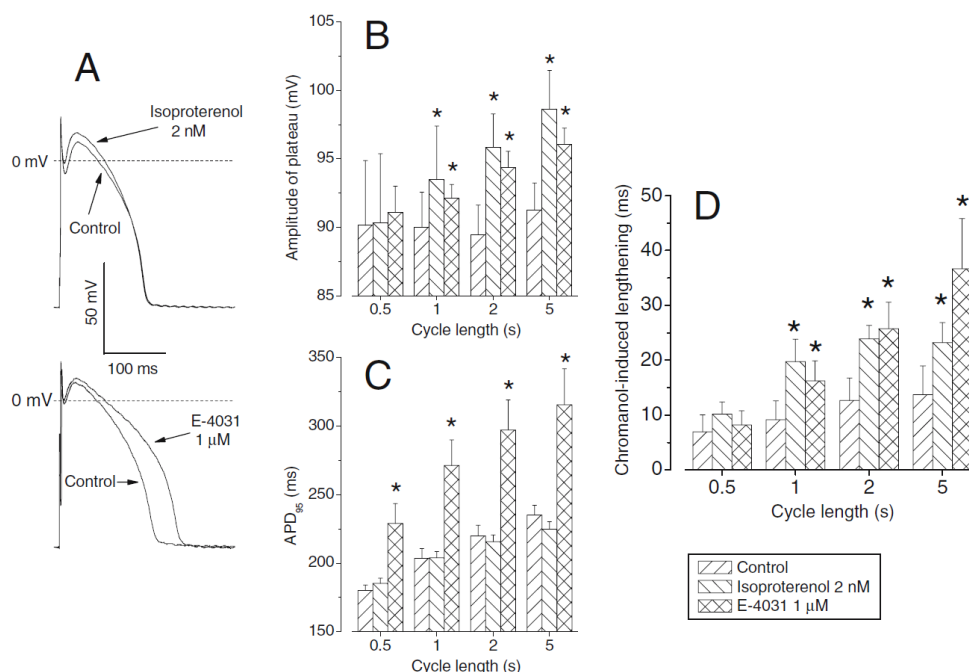
18. ábra. 10 μM Chromanol hatása a kutya kamrai akciós potenciáljára

A: Reprezentatív akciós potenciálok 10 μM Chromanol alkalmazása előtt és után. Látható, hogy a Chromanol az AP platójának emelése nélkül nyújtja meg az AP-t.

B: 10 μM Chromanol hatása különböző ingerlési frekvenciákon az AP hosszára. A Chromanol által kiváltott AP nyújtás nagy ciklushosszak esetén erőteljesebb.

A Chromanol hatása Isoproterenol vagy E-4031 jelenlétében

A 10 μM chromanol AP hosszára gyakorolt hatását megvizsgáltuk mind 2 nM isoproterenol, mind 1 μM E-4031 előkezelést követően (19. ábra). A 2 nM isoproterenollal történő előkezelés szignifikáns módon megemelte az AP plató magasságát anélkül, hogy a hosszát megváltoztatta volna. A plató emelő hatás statisztikailag szignifikánsnak bizonyult és a ciklushossz növelésével arányosan nőtt. 1 μM E-4031 hasonló mértékben emelte a plató magasságot mint 2 nM isoproterenol, de ezen túlmenően az AP hosszát is frekvenciafüggő módon nyújtotta. 10 μM chromanol hatására mindkét csoportban, valamennyi vizsgált frekvencián szignifikáns módon megnyúlt az AP, de az AP nyújtó hatásban az előkezeléstől függetlenül nem találtunk különbséget (D panel). Összefoglalva a tapasztalatokat megállapíthatjuk, hogy a Chromanol azonos mértékű AP nyújtást idézett elő azon sejteken, amelyeknek csak a plató magassága emelkedett meg és azokon a sejteken, amelyekben a plató magasság emelésén kívül még AP nyúlást is előidéztünk.



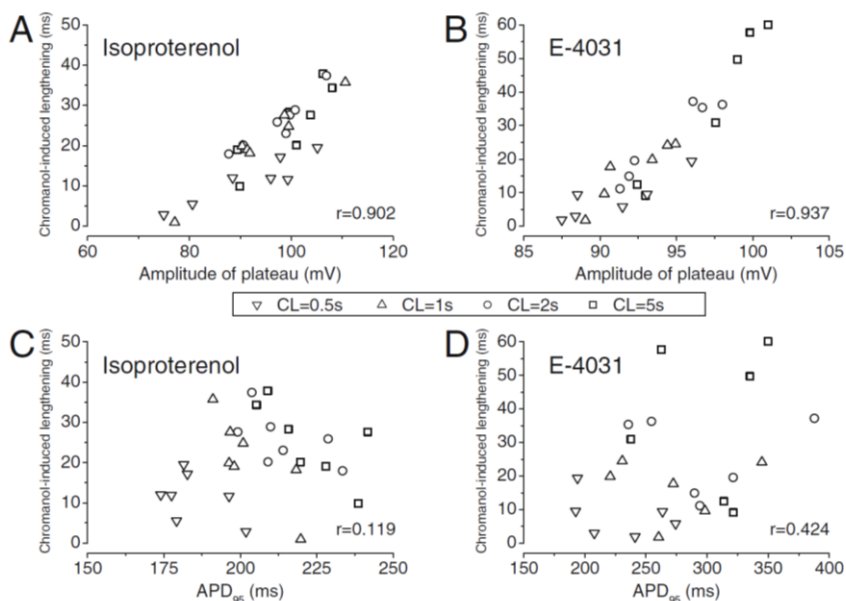
19. ábra. Chromanol hatása az AP-ra Isoproterenol és E-4031 előkezelés után.

A: 2 nM Isoproterenol (felső panel) és 1 μ M E-4031 (alsó panel) hatása reprezentatív AP-ken bemutatva

B-C: 10 μ M Chromanol hatása az AP plató magasságára (B) és hosszára (C)

D: A Chromanol által okozott nyújtás mértéke hasonló az isoproterenollal és E-4031-el előkezelt sejtekben

A jelen vizsgálatok közvetlen célja az volt, hogy meghatározzuk, az AP platója vagy hossza játszik jelentősebb szerepet az I_{Ks} aktiválásában. Ennek eldöntésére meghatároztuk a Chromanol által okozott AP nyúlás és az AP hossza, illetve platómagassága közötti korrelációt mindkét előkezelt csoportban. Tapasztalataink szerint a Chromanol által előidézett nyúlás jó korrelációt mutatott a plató magassággal mind az isoproterenol ($r=0.902$), mind az E-4031 előkezelést követően (20. ábra A-B panelek). Ezzel szemben az AP hossza egyik csoportban sem mutatott korrelációt az I_{Ks} gátlását követő AP nyúlással (20. ábra, C-D panelek). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az I_{Ks} aktivációjában az AP plató magassága jelentősebb meghatározó erővel bír, mint a hossza.



20. ábra. Korreláció a Chromanol AP nyújtó hatása és az AP plató magassága, valamint hossza között.

A-B: Isoproterenol vagy E-4031 előkezelést követően a Chromanol által kiváltott AP nyújtó hatás mértéke a plató magasságával mutat jó korrelációt.

C-D: A Chromanol által kiváltott AP nyúlás nem mutat korrelációt az AP hosszával (APD_{95})

A Chromanol hatása tonizálással módosított AP-n

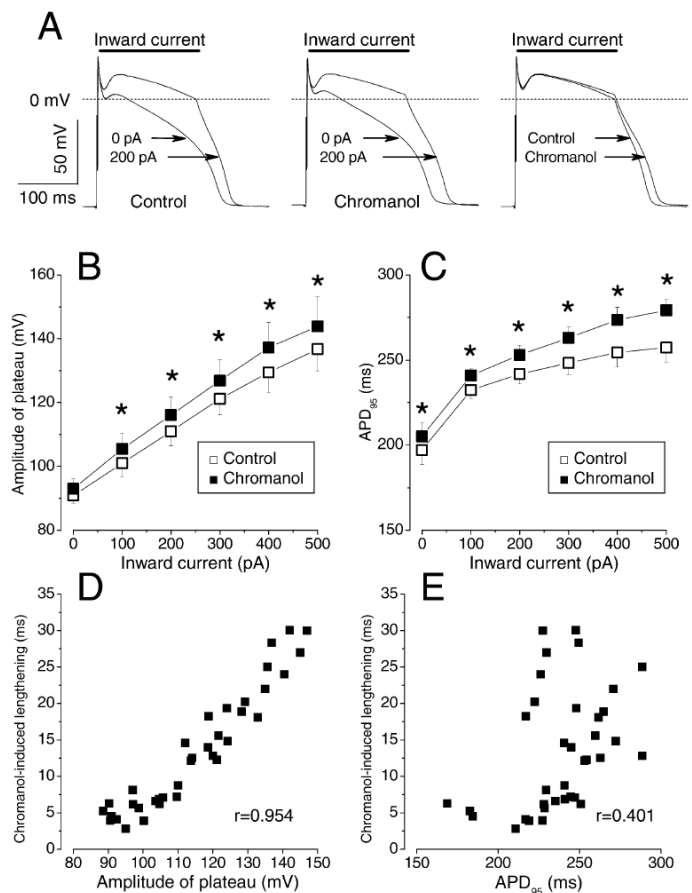
A fenti két farmakonnal történő előkezelés megváltoztatta az AP hosszát és plató magasságát, amely a különböző ingerlési frekvenciákkal kombinálva eléggé széles tartományra szélesítette ki az AP paramétereit ahhoz, hogy a korrelációs vizsgálatot sikeresen el tudjuk végezni. Nagy hátránya azonban a farmakológiai módszereknek, hogy nem mindig „tiszták”. Esetünkben például az isoproterenol nemcsak áthangolta a sejt úgyszólván valamennyi szignalizációs útvonalának aktivitását, de direkt módon megváltoztatta az I_{Ks} kinetikáját is [73, 115]. Éppen ezért a megfigyeléseink megerősítése céljából tonizáló áram alkalmazásával is módosítottuk az AP paramétereiket, majd ilyen körülmények között megmértük a Chromanol AP nyújtó hatását. Ehhez az AP-k platója alatt, a felszálló szárhoz szinkronizálva 170 ms hosszú depolarizáló négyszög pulzusokat alkalmaztunk 100-500 pA tartományban 100 pA-es lépésközzel. Ezeket a tonizáló pulzusokat a chromanol kezelés előtt és után alkalmazva az AP-k hosszát és plató magasságát olyan széles tartományban változtattuk meg, amely lehetővé tette a korrelációs vizsgálatok elvégzését (21. ábra). Megfigyeléseink szerint a Chromanol által előidézett AP

21. ábra. Chromanol AP nyújtó hatása depolarizáló árammal tonizált sejteken.

A: Reprezentatív akciós potenciálok, melyeken a plató magasságát depolarizáló árammal megemeltük. A bal oldali panel a kontroll viszonyokat mutatja, a középső panel a 10 μ M Chromanol jelenlétében készült. A jobb oldali panel mutatja a kialakult AP hosszabbodást.

B-C: A plató magasság emelkedése (B) és az AP meghosszabbodása (C) Chromanol kezelést követően. A Chromanol által előidézett változás arányos a depolarizáló áram erősségével.

D-E: A Chromanol által kiváltott AP hosszabbodás jó korrelációt mutat a plató magassággal, de nem korrelál az AP eredeti hosszával.



nyújtó hatás ebben az esetben is az AP hosszával mutatott korrelációt és a plató magassággal nem. Ezen a ponton tehát kijelenthetjük, hogy két független módszerrel ugyanarra a következtetésre jutottunk.

Az I_{Ks} modellezésével tett megfigyelések

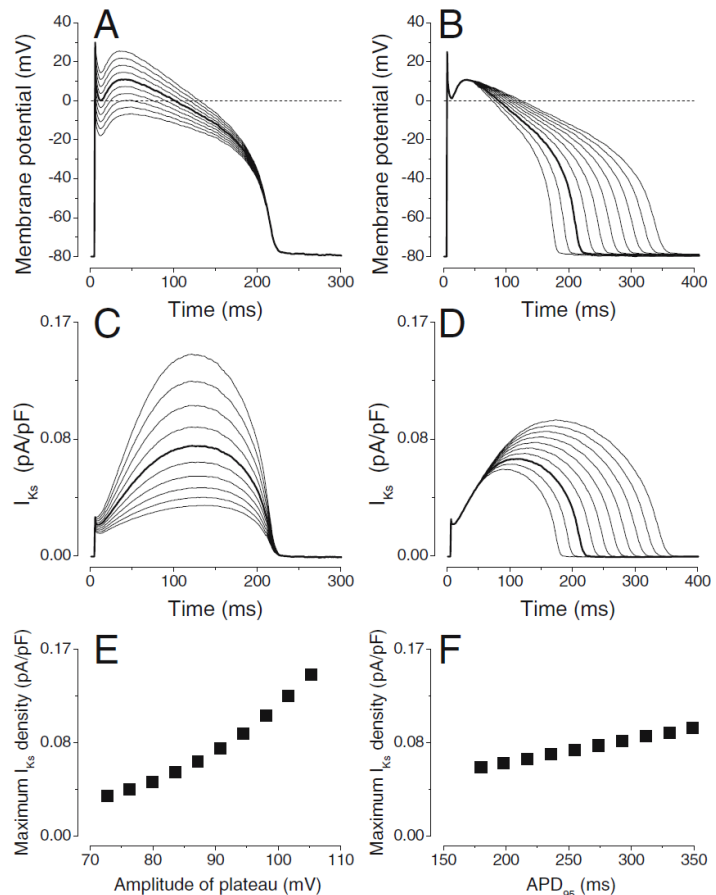
Megfigyeléseink további megerősítése, illetve a látott összefüggések mechanizmusának megértése céljából számítógépes szimuláció segítségével tanulmányoztuk az AP hosszának, illetve plató magasságának hatását az I_{Ks} AP alatti profiljára. A szimulációhoz Viswanathan modelljét használtuk [116]. Voltage clamp viszonyokat modelleztünk, parancsjelként különböző hosszúságú és plató magasságú AP-kat használva. Az eltérő paraméterű AP-kat egy korábban általunk kutya kamrai szívműködésen rögzített, tipikusnak mondható AP matematikai úton történő átszabásával állítottuk elő egy interpolációs algoritmus segítségével. Két AP sorozatot készítettünk, az egyik esetben a plató magasságát, a másik esetben pedig a hosszát változtattuk az élettani értékeket jelentősen meghaladóan széles határok között (22. ábra, A és B panelek). Ezeket az AP-kat parancsjelként alkalmazva a modell segítségével meghatároztuk az áramok AP alatti lefutását (22. ábra, C és D panelek), majd ezeket az

22. ábra. Az I_{Ks} AP alatti lefutásának modellezése különböző AP konfigurációk felhasználásával.

A-B: Egy, a mérési adataink közül kiválasztott reprezentatív AP alakját interpolációs algoritmus segítségével megváltoztattuk. A vastag vonal mutatja az eredeti AP-t, az A panelen a plató, a B panelen pedig az AP hosszának változtatása látszik.

C-D: A két fenti AP sorozathoz a Vishwanathan modell alapján számított I_{Ks} profilok.

E-F: A C-D paneleken látható áramgörbék amplitúdója és az AP plató magassága (E) valamint hossza (F) közötti összefüggés. Látható, hogy a vizsgált tartományban az I_{Ks} amplitúdója sokkal érzékenyebb AP platójának változására, mint az AP hosszának növekedésére.



áramjeleket hagyományos módon elemeztük. Az elemzéseink azt mutatták, hogy az I_{Ks} aktiválásában az AP plató magassága lényegesen nagyobb szerepet játszik, mint a hossza (22. ábra, E és F panelek). Míg az általunk vizsgált 70-110 mV terjedelmű plató magasság tartományban az I_{Ks} amplitúdója megnégyszereződött, a 160-350 ms terjedelemben változtatott AP hossz az áram amplitúdóját kevesebb, mint kétszeresére növelte csupán. Modellkísérleteink tehát összhangban vannak az előzőleg ismertetett megfigyeléseinkkel. A Chromanol AP nyújtó hatása azért erősebb a magasabb platóval rendelkező AP-ken, mert azokon az I_{Ks} amplitúdója, így módon annak gátlásakor kieső áram nagysága nagyobb.

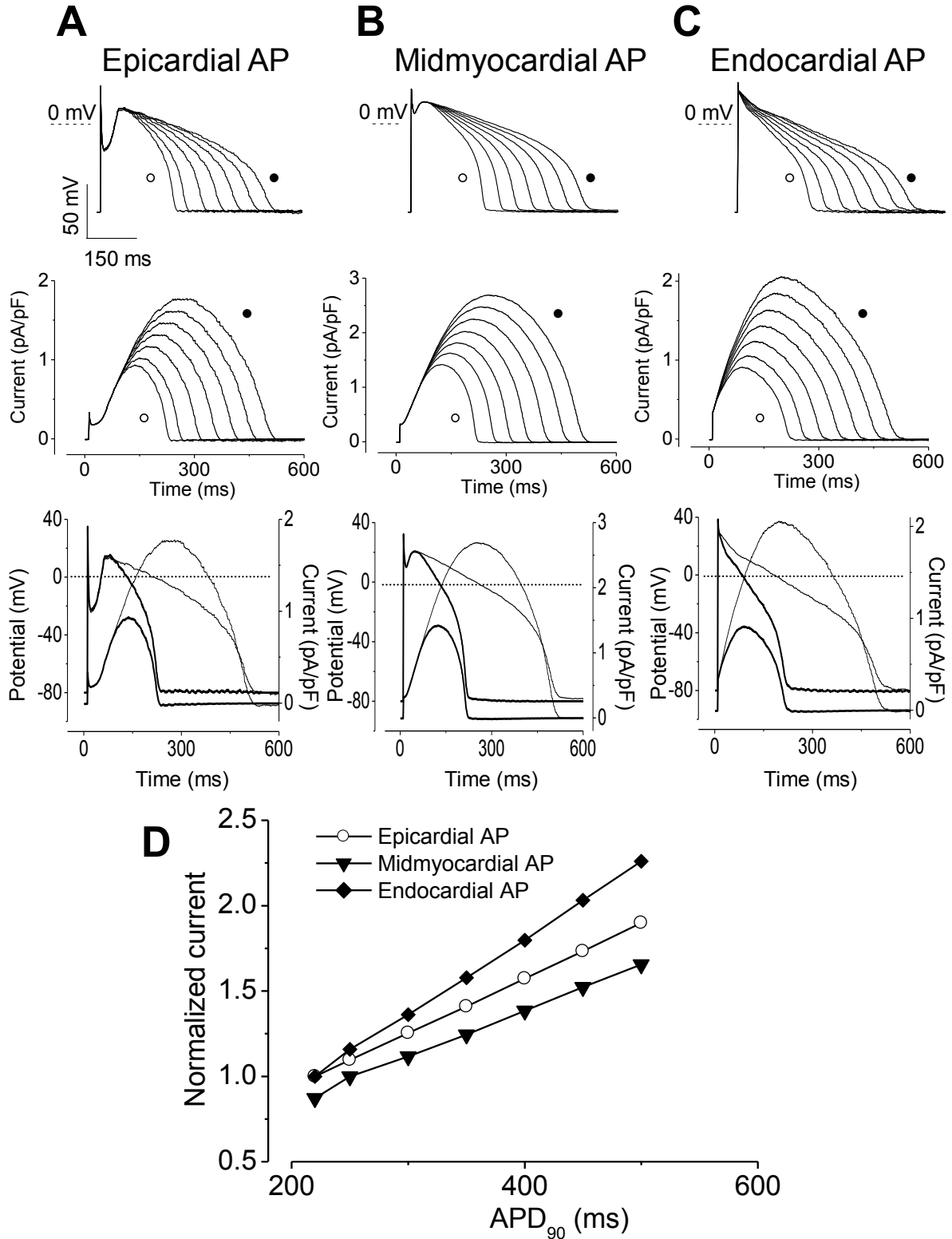
Megfigyeléseink két fontos következtetés levonására adnak lehetőséget. Egyrészt, kísérleteink azokat a beszámolókat erősítik meg, amelyek szerint az I_{Ks} a kamrai AP fontos repolarizáló árama. Másodsorban, adataink arra utalnak, hogy az I_{Ks} repolarizációhoz való hozzájárulásának mértékét az AP plató magassága határozza meg. Azok a korábbi tanulmányok, melyek szerint az E-4031 előkezelte szívműködéseken a chromanol AP nyújtó hatása jelentősen felerősödik, ugyancsak az általunk javasolt magyarázatot erősítik meg [73, 74].

Következtetésünket alátámasztja, hogy az I_{Ks} gátlást követően valamilyen mértékű, de a szignifikancia szintet el nem érő APD nyúlást még azokban a kísérletekben is rendre megfigyelték, amelyekben arra a végkövetkeztetésre jutottak, hogy az I_{Ks} repolarizációban játszott szerepe elhanyagolható [69, 72, 73]. A mi kísérleteinkben megfigyelt AP nyúlás kismértékű volt ugyan, de következetesen szignifikáns. Másrésztől, megfigyeléseink szerint az I_{Ks} gátlást követő AP nyúlás mértéke drámaian megnőtt, ha az AP platóját előzetesen isoproterenollal, E-4031-el, vagy depolarizáló hatású tonizáló árammal megemeltük. Következtetéseink további megerősítéséül szolgálnak azon computer szimulációs adataink, melyek szerint az I_{Ks} aktivációjában az AP plató magassága sokkal fontosabb, mint a hossza. A plató feszültségértékében megfigyelhető néhány millivolt emelkedés, tehát az I_{Ks} feszültségfüggő aktivációjában olyan jelentős növekedést okoz, amelyhez képest elmarad az AP jelentős megnyúlásának, akár megduplázódásának következménye is.

Az I_{Ks} és az AP feszültségprofiljának fent elemzett viszonya magyarázatot adhat az irodalomban található adatok immár csupán látszólagos ellentmondására. Tengeri malacban például a kamrai sejtek plató magassága +30 mV körüli érték, míg a Purkinje sejtekben a plató a negatív feszültségtartományban található. Az általunk szolgáltatott magyarázat tükrében világossá válik, hogy az I_{Ks} gátlás miatt vált ki jelentős AP nyúlást a tengeri malac kamrai sejtjein [66], ugyanakkor pedig miért hatástalan a Purkinje preparátumon [72]. A mi kísérleteinkben (kutya kamrai sejteken) a plató magasság +10 mV, ami jól egybevág az általunk megfigyelt kismértékű AP nyúlással az I_{Ks} gátlást követően.

Kísérletes adataink és az általunk alkalmazott *in silico* modell predikciói között azonban van egy jelentős ellentmondás. Kísérletes viszonyok között ugyanis nem találtunk korrelációt az AP hossza és a Chromanol kiváltotta AP nyúlás között. Ezzel szemben a modell szerint az AP hossza is prediktív értékű, bár függvénye kevésbé meredek, mint a plató magasság esetében. Az ellentmondást feloldhatjuk, ha figyelembe vesszük, hogy az *in silico* kísérletekben a plató vagy az AP hossz változásának következményeit „tisztá” viszonyok között tudtuk vizsgálni. Míg az E-4031 vagy a tonizálás mind a plató magasságát, mind az AP hosszát megváltoztatta (ha eltérő mértékben is), a modellkísérletekben a két paramétert egymástól teljesen függetlenül tudtuk változtatni (19, 21 és 22 ábrák). Az E-4031 előkezelés esetében tehát a néhány millivolt plató emelés hatása elfedte az AP-t több tíz millisecundummal nyújtó hatás következményeit.

A jelenség mélyebb megértését segítheti, ha összevetjük az AP nyújtás hatását az I_{Ks} aktivációjára a szív különböző régióiból származó sejtek esetén (23. ábra). A szívizomsejtek AP-inek transmuralis irányban jól ismert inhomogenitása miatt az epicardialis, endocardialis és mid-myocardialis eredetű sejtek platója jellegzetes szerkezetbeli különbségeket mutat (részletesebben lásd az ionáramok transmuralis



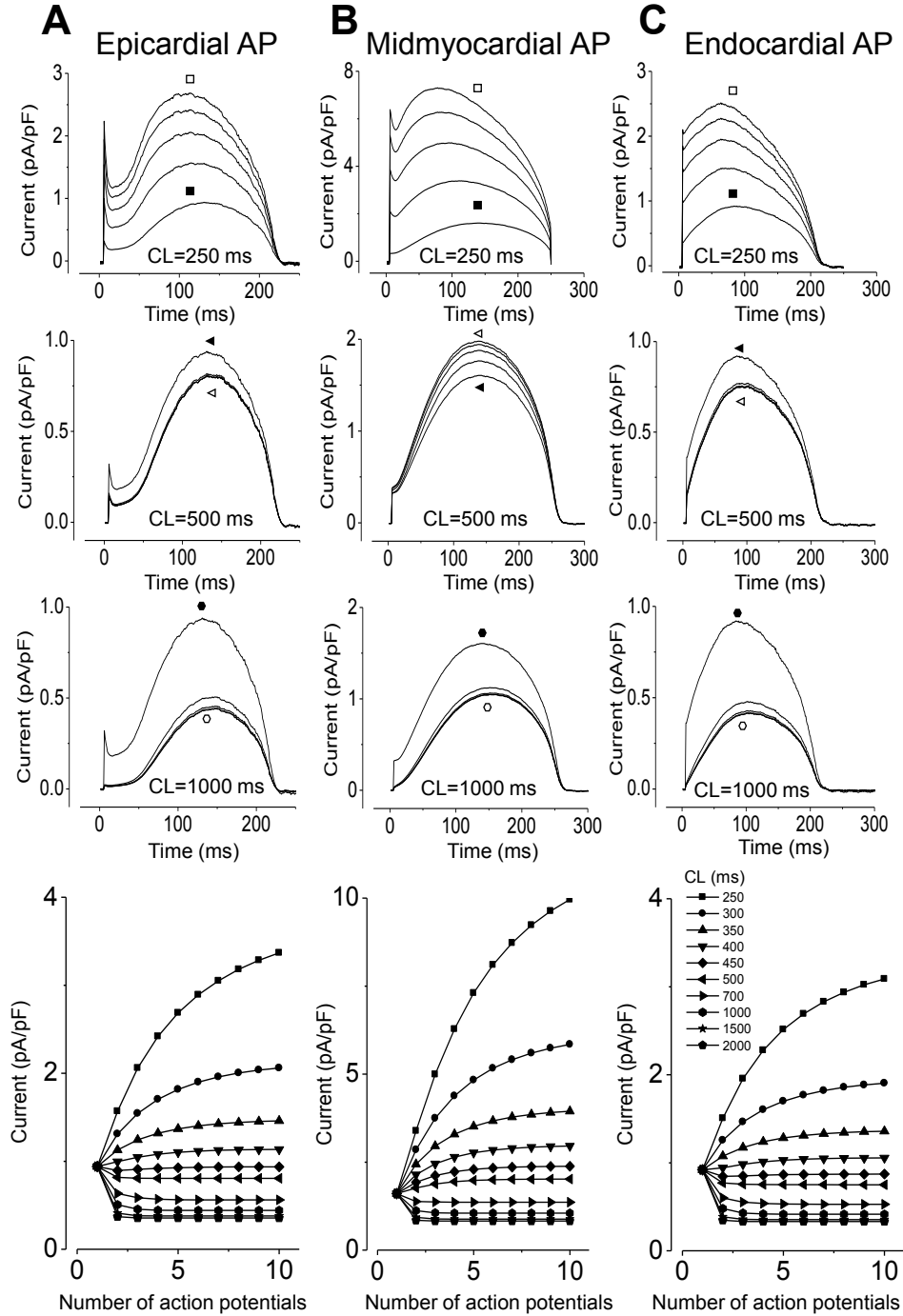
23. ábra. Az I_{Ks} modellezése EPI, MID és ENDO sejtek akciós potenciáljain.

A különböző AP konfigurációkhoz (felső sor) számított áramgörbék (második sor) mutatják, hogy azonos AP nyúlás esetén az I_{Ks} különböző mértékben növekszik meg az EPI, MID illetve ENDO sejteken (alsó, D panel).

inhomogenitásának megbeszélésénél). Ezekben a modellkísérletekben adatbázisunkból kiválasztottunk három reprezentatív AP-t az epicardialis, mid-myocardialis és endocardialis régióból. Ezeket az AP-eket a már korábban ismertettekhez hasonlóan különböző hosszúságúra állítottuk be, majd voltage clamp üzemmódban betápláltuk a modellbe. Annak ellenére, hogy a három AP sorozat azonos hosszúságú AP-kből állt, jelentős eltéréseket figyelhetünk meg az I_{Ks} AP alatti lefutásának alakulásában. Bár az AP nyújtására mindhárom esetben az I_{Ks} amplitúdó növekedése volt a válasz, a növekedés mértéke a legnagyobb az endocardialis sejtekben, legkisebb a mid-myocardialis sejtekben, az epicardialis sejtekben pedig a kettő között helyezkedik el (23. ábra D panel). Ezek az eredmények világossá teszik, hogy viszonylag kisciklusos változás a plató szerkezetében, illetve magasságában jelentősen módosítja az I_{Ks} amplitúdóját. Emiatt, ha kísérletes viszonyok között mind a plató, mind az AP hossza megváltozik, a plató hatása lesz a domináns tényező az I_{Ks} profiljának alakításában. Tehát az I_{Ks} repolarizációhoz való hozzájárulását a plató magassága határozza meg, ami egy érdekes példa a membrán egyik ionáramának koordinációjára valamint a membránpotenciál és egy ionáram közötti komplex kapcsolatra.

A feszültség – áram - AP hossz kapcsolat erősségét jelentősen befolyásolja az ingerlési frekvencia. Az I_{Ks} egyik jellegzetessége, hogy a csatorna időfüggő módon nem inaktiválódik, ellenben alacsony feszültségértékeken lassú deaktivációt mutat [116]. Ezért magas ingerlési frekvenciákon a diastole rövidülése miatt a nyitott állapotban lévő csatornák száma az idő előrehaladtával egyre nagyobb lesz. Ezt nevezzük az áram magas ingerlési frekvencián megfigyelhető akkumulációjának. Modellkísérletünkben megvizsgáltuk, hogy miként hat az ingerlési frekvencia változása az I_{Ks} AP alatti profiljára. Élve az *in silico* kísérletek nyújtotta egyedi előnnyel, ezekben a kísérletekben csupán a diastole hosszát változtattuk az ingerlési frekvencia függvényében, az AP paramétereit változatlanul hagytuk. Ez a leegyszerűsítés az elektrofiziológiában megszokott eljárás az ingerlési frekvencia hatásainak vizsgálatokor [114, 117]. A modell futtatásakor az alábbi protokollt követtük: 2 Hz frekvencián lefuttattunk 100 ciklust, ami stabilizálta az AP paramétereit. Ezután egyetlen lépésben átváltottunk a vizsgálandó frekvenciára és rögzítettük, majd analizáltuk az első tíz AP alatti I_{Ks} profilt. Ahogy a 24. sz. ábrán látható, a magas frekvencián az AP alatti áram amplitúdó jelentős frekvencia-függést mutat. Magas frekvenciákon az áram amplitúdója nagyobb, alacsony frekvencián kisebb. Ez arra enged következtetni, hogy magasabb ingerlési frekvenciákon az I_{Ks} repolarizációhoz való hozzájárulása jelentősebb, minek eredményeként az I_{Ks} modulálásakor (aktiválás, gátlás) az AP hosszában várható változások relatív nagysága is nagyobb lesz.

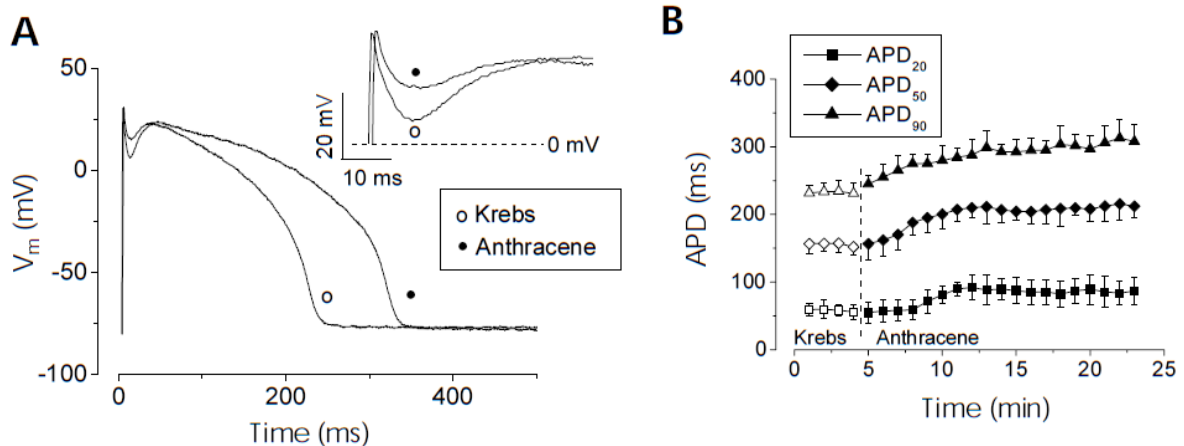
A fentiek megértése jelentősen hozzájárulhat az I_{Ks} aktiválását / gátlását követő AP változások megértéséhez. Elméleti jelentőségén túl azonban a feszültségprofil - I_{Ks} közötti koordináció



24. ábra. Az I_{Ks} szimulációja 2 Hz-es steady state ingerlés utáni frekvencia váltást követően.

Az első három sor mutatja a szív eltérő rétegeiből származó (EPI, MID és ENDO) AP-k alatt számított áramprofilokat különböző ingerlési frekvenciákon. A tömött szimbólum a frekvenciaváltás utáni első áramgörbét mutatja, az üres a sorozat ötödik tagját.

Az alsó sorban az áram amplitúdók alakulása látható a frekvenciaváltást követően.



25. ábra. A klorid áram gátlásának hatása az akciós potenciál (AP) alakjára

A: Reprezentatív AP-ok amelyek 0.5 mM ANTRA komplex hatásait mutatják be. A kontrollhoz képest az AP pedig jelentős mértékben megnyúlik, az incisura mélysége pedig csökken, de plató emelkedés nélkül.

B: Az AP hosszának változása az I_{Cl} gátlását követően a behatási idő függvényében. Látható, hogy szemben az APD_{20} és APD_{50} értékekkel az APD_{90} értéke még húsz perc behatási idő után sem stabilizálódott. (n=8)

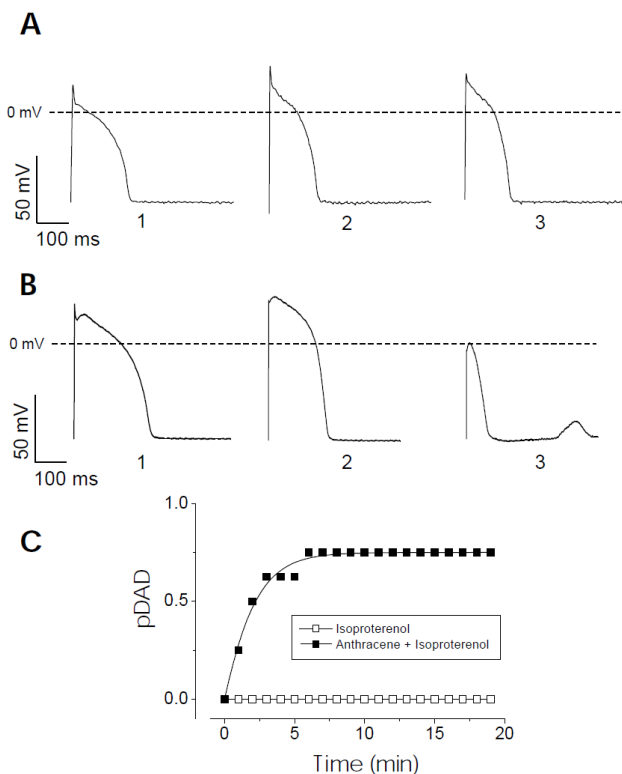
mechanizmusának ismerete konkrét klinikai relevanciával is bír. Az I_{Ks} gátlók (chromanol, HMR-1556) előállításának célja eredetileg egy olyan antiaritmias gyógyszer megalkotása volt, amely mentes az I_{Kr} gátlók igen előnytelen fordított frekvencia függő hatásától [118, 119]. Fentebb ismertetett megfigyeléseink és korábbi irodalmi adatok [66, 73] azonban arra utalnak, hogy az I_{Ks} gátlás következményeit is jelentős mértékben befolyásolja az ingerlési frekvencia, vagy az AP alakja. A szív különböző régióiból származó AP-vel végzett szimulációs kísérleteink eredményei felvetik annak lehetőségét, hogy az I_{Ks} gátlók növelhetik az AP transmuralis inhomogenitását, amiről ismert, hogy a ritmuszavarok kockázatát növeli.

6.4.1.3. Az AP és a klorid áram viszonya

A klorid áram repolarizációhoz és depolarizációhoz való hozzájárulására az AP-n megfigyelhető, az áram ANTRA-val történő gátlását követő változásokból következtettünk. A méréseket hegyes mikrolelektrodával ($R > 20 \text{ M}\Omega$) végeztük a dialízis megelőzése miatt, külső oldatként pedig Tyrode oldat helyett bikarbonát tartalmú KREBS oldatot használtunk, megelőzendő egy esetleges intracelluláris acidosis I_{Cl} aktiváló hatását. 0.5 mM ANTRA hatására az AP hossza valamennyi mért értéknél lassú

26. ábra. A klorid áram gátlása serkenti az Isoproterenol indukálta utódepolarizációk kialakulását

A panel: Reprezentatív akciós potenciálok, amelyeken a 5 nM Isoproterenol hatására kialakuló konfiguráció változások láthatóak. 1: Kontroll, 2-3: AP rövidülés.
B panel: ANTRA és 5 nM Isoproterenol hatására kialakuló AP rövidülés és utódepolarizációs jelenségek. 1: Kontroll, 2: AP rövidülés, 3: Késői utódepolarizáció.
C panel: A klorid áram gátlása gyorsítja az ISO kiváltotta utódepolarizációk kialakulását. Üres kocka: Az Isoproterenol kezelés hatására utódepolarizációt mutató sejtek aránya (p) az idő függvényében. Telt kocka: 10 perc ANTRA előkezelést követően az Isoproterenol hamarabb és a sejtek több mint felében váltott ki utódepolarizációkat.



növekedést mutatott és ezzel párhuzamosan lecsökkent az incisura mélysége (25. ábra). Bár az AP nyúlása minden vizsgált paraméteren (APD_{20} , APD_{50} , APD_{75} , APD_{90}) kimutatható volt, a legnagyobb relatív hosszabbodást az APD_{20} esetében figyeltük meg, amit azzal magyarázhatunk, hogy ez az érték található a Cl^- egyensúlyi potenciáljától a legtávolabb.

Az ANTRA fokozza az utódepolarizációk kialakulását

Megvizsgáltuk a klorid áram szerepét a késői utódepolarizációk (DAD) kialakulásában három elterjedten használt farmakológiai modell segítségével. Az egyes esetekben 5 nM Isoproterenollal, 3.6 mM CsCl-al, vagy 200 nM Ouabainnal előkezeltük a sejteket. Ezekben az ismert DAD modellekben [120] azt vizsgáltuk, hogy az ANTRA kezelés hogyan változtatja meg a DAD-ok kialakulásának gyakoriságát.

Az Isoproterenol az alkalmazott 5 nM koncentrációban jellegzetes AP rövidülést és plató emelkedést okozott, de nem váltott ki DAD-ot a vizsgálat 20 percén belül (25. ábra A panel). Azonban, ha az 5 nM Isoproterenollal együtt 0.5 mM ANTRA-val is kezeltük a sejteket, akkor öt percen belül nyolcból hat sejten megjelentek a DAD-k. EAD-ok kialakulását egyetlen alkalommal sem figyeltük meg, bár az Isoproterenolról ismert, hogy az DAD és EAD kialakulását egyaránt elősegíti [57, 120, 121].

27. ábra. A klorid áram gátlása serkenti a ouabain indukálta utódepolarizációk kialakulását

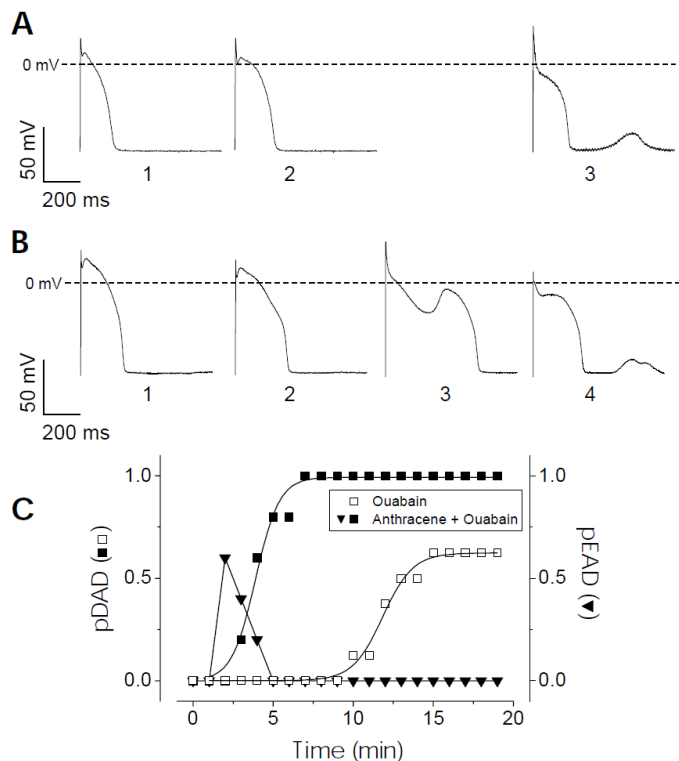
A: Reprezentatív akciós potenciálok (AP) amelyeken a ouabain hatására kialakuló konfiguráció változás és utódepolarizáció láthatóak. 1: Kontroll, 2: AP nyúlás, 3: Késői utódepolarizáció.

B: ANTRA és ouabain hatására kialakuló AP nyúlás és utódepolarizációs jelenségek.

1: Kontroll, 2: AP nyúlás, 3: Korai utódepolarizáció, 4: Késői utódepolarizáció.

C: A klorid áram gátlása gyorsítja a ouabain kiváltotta utódepolarizációk kialakulását.

10 perc ANTRA előkezelést követően a ouabain hamarabb és a sejtek nagyobb hányadában vált ki korai és késői utódepolarizációkat.



Hasonló eredményre vezettek az Ouabainnal végzett kísérleteink (27. ábra). A Ouabain ugyan az alkalmazott 200 nM koncentrációban tíz perc után egymagában alkalmazva is kiváltott DAD-kat, de az ANTRA-val együtt alkalmazva öt percen belül valamennyi sejten megjelentek az utódepolarizációk (n=8). Érdekes módon, Az ANTRA alkalmazását követően átmeneti jelleggel a sejtek felében megfigyeltük EAD-ok kialakulását is. Hasonló megfigyeléseket tettünk a CsCl modell esetében is, ahol a Cs^+ önmagában 10-20 percen belül váltott ki DAD-kat, de ANTRA adását követően valamennyi sejtben két percen belül megjelentek az utódepolarizációk (nem mutatok be ábrát).

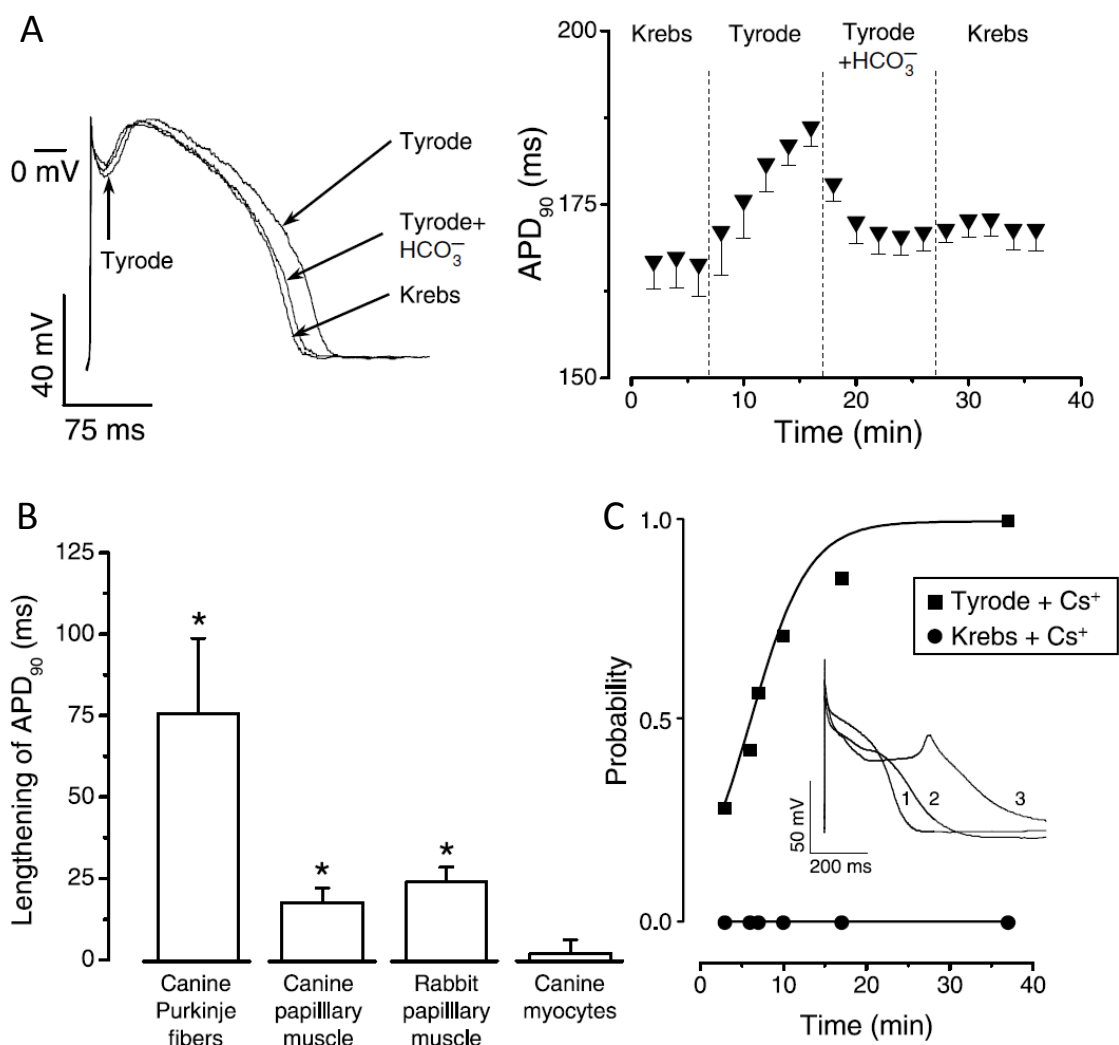
Az általunk tett megfigyelések ellentétben állnak azokkal az elméletekkel, melyek szerint az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ elősegítheti a DAD-ok kialakulását [65, 122]. A mi adataink szerint ugyanis az I_{Cl} gátlása az ami a DAD-ok kialakulását segíti. Természetesen adódik a kérdés, hogy a nyugalmi membránpotenciál közelében, ahol az I_{Cl} már feltehetően depolarizáló hatású (14. ábra) miként fokozhatja a I_{Cl} gátlása a depolarizációs jelenségeket? A DAD-ok elsődleges oka az SR Ca^{2+} -al való túltöltődése (calcium overload) [57, 120]. Az AP konfigurációjában ANTRA hatására bekövetkező AP nyúlás meghosszabbítja a platót és ezzel lehetőséget ad a fokozott Ca^{2+} belépésre. Amennyiben feltételezzük, hogy az ANTRA a DAD-ok kialakulását fokozó hatását ilyen közvetett módon váltja ki, akkor az ellentmondás feloldható. Ebből

azonban az is következik, hogy az I_{Cl} ugyan hozzájárulhat depolarizáló hatásával a DAD-ok kialakulásához, de ez a szerepe az I_{NCX} -el összehasonlítva valószínűleg csekély. Ha ugyanis a I_{Cl} lenne a domináns töltéshordozó a DAD alatt, az ANTRA gátló hatása valami módon lecsökkentené a DAD-ok kialakulását.

6.4.1.4. A bikarbonát puffer hatása az utódepolarizációk kialakulására

Mivel az előzőekben az I_{Cl} gátlást követően kialakuló DAD-ok gyakoriságát tanulmányoztuk, az I_{Cl} ismert pH érzékenysége miatt megvizsgáltuk, hogy az intracellulárisan is pufferként működő bikarbonát ion hogyan hat az utódepolarizációk kialakulására. Erre azért volt szükség, hogy kizárhassuk az ANTRA gátlás mellett esetlegesen jelentkező acidózis érzékeny klorid áramok aktiválódásának lehetőségét. Ezekben a mérésekben három különböző összetevőjű extracelluláris oldat jelenlétében kísértünk meg Cs^+ segítségével utódepolarizációkat kiváltani. A vizsgált oldatok az alábbiak voltak (az összetevők koncentrációi mM-ban értendőek): 1 Krebs oldat: Na^+ 142, K^+ 5.6, Mg^{2+} 1, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 128.6, $H_2PO_4^-$ 1, HCO_3^- 26, glucose 11; 2 Tyrode oldat: Na^+ 142, K^+ 5.6, Mg^{2+} 1, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 154.6, HEPES 5, glucose 11; 3 Bikarbonát-Tyrode: Na^+ 142, K^+ 5.6, Mg^{2+} 1, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 128.6, HCO_3^- 26, HEPES 5, glucose 11. A Tyrode és Krebs oldatokat széles körben használják elektrofiziológiai méréseknél, a Bikarbonát-Tyrode (továbbiakban BTy) egy Tyrode alapú oldat, melyben a Krebs-el megegyező koncentrációjú bikarbonát ion található.

Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a bikarbonát ion milyen hatással van az AP morfológiájára. Megállapítottuk, hogy bikarbonát ion hiányában az AP szignifikánsan hosszabb (28. ábra) és nincs különbség a Krebs és BTy oldatokban mért AP hosszok között. A különböző preparátumok bikarbonát érzékenysége jelentős különbséget mutatott és az általunk használt izolált kamrai szívműsejtek viszonylag kevésbé voltak érzékenyek (B panel). Amikor CsCl-al utódepolarizációkat próbáltunk meg kiváltani, a bikarbonát iont nem tartalmazó Tyrode oldatban valamennyi sejt mutatott utódepolarizációs aktivitást a mérés ideje alatt. Ezzel szemben a bikarbonát ion tartalmú közegben a mérések ideje alatt egyetlen EAD-ot, vagy DAD-ot sem figyeltünk meg. Ezekből a megfigyelésekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy az ANTRA-val végzett kísérletekben a pH érzékeny klorid áram biztosan nem aktiválódhatott.



28. ábra. A bikarbonát ion hatása az AP hosszára és az utódepolarizációk jelentkezésére kutya kamrai sejtekben.

A: Bikarbonát ion hatása kutya kamrai akciós potenciálra izolált sejten. Látható, hogy a bikarbonát ion hiányában, az AP megnyúlik. A Krebs és a Bikarbonát tartalmú Tyrode oldatban mért AP-k hossza nem különbözik egymástól szignifikánsan.

B: Tyrode oldat által okozott AP nyúlás többféle preparátumon.. Az izolált sejtek a legkevésbé érzékenyek a bikarbonát ion hiányára.

C: Bikarbonát jelenlétében a Cs^+ nem vált ki utódepolarizációkat. A reprezentatív AP-k a Tyrode oldatban bekövetkező AP nyúlást, majd EAD megjelenését mutatják.

6.4.1.5. Az egyes ionáramok és az AP paraméterei közötti korrelációk elemzése

Adataink elemzése során világossá vált, hogy az egyes ionáramok nagysága jelentős sejt-sejt közötti különbséget mutat. Az áramcsúcsok alapján számított standard deviáció mértéke több esetben meghaladta az átlagok értékének felét, amely igen nagy egyedi szórást jelez. Ez annál is inkább érdekes megfigyelés, mert az AP paraméterek standard deviációinak átlaghoz viszonyított relatív nagysága ennél jóval kisebb. Természetes módon vetődik fel a kérdés, hogy felismerhető-e valamiféle mintázat, korreláció az egyes áramcsúcsok nagysága között, vagy az áramcsúcsok és az AP paraméterei között? Tükröződik-e például az erősebb, vagy gyengébb depolarizáló (vagy repolarizáló) áram az AP hosszában, vagy plato magasságában?

Mivel az APD_{90} és az $I_{Ca,L}$ csúcsának amplitúdója, vagy az $I_{Ca,L}$ általa hordozott töltésmennyiség között a hagyományos statisztikai eljárásokkal korrelációt nem tudtunk kimutatni, egy mesterségesen tisztított mintán végeztük el az analízist a lehetséges korreláció biztos kizárására. Az AP paraméterei és az egyes ionáramok paraméterei közötti korreláció hiányát ugyanis azzal is magyarázni lehet, hogy a nagy statisztikai ingadozás elfedi az egyébként jelenlévő korrelációt. Az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} esetében a teljes halmazból kiválasztottuk az öt-öt legkisebb és legnagyobb töltésmennyiséget (Q_{NISO} és Q_{CHROMA}) szállító sejteket és ezek AP paramétereit hasonlítottuk össze egyszerű páratlan t-próbával. Létrehoztunk tehát két „kis ionárammal” és „nagy ionárammal” működő sejteket tartalmazó csoportot és arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek AP paraméterei különböznek-e egymástól? Ahogy az a II. sz. táblázat adatain látható, az ilyen módon kialakított csoportok sejteinek AP-i között statisztikailag szignifikáns különbség nem volt. Következésképpen az egyes ionáramok paraméterei nem prediktívek az AP paramétereire.

II. Táblázat. A kamrai szívimsejteken nincs kapcsolat az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} által szállított töltésmennyiség és az AP paraméterei között. A kis töltésmennyiséggel működő sejtek AP hossza és plato magassága nem különbözik statisztikailag szignifikáns mértékben a nagy töltésmennyiséggel működőkéttől. ***: $p < 0.001$.

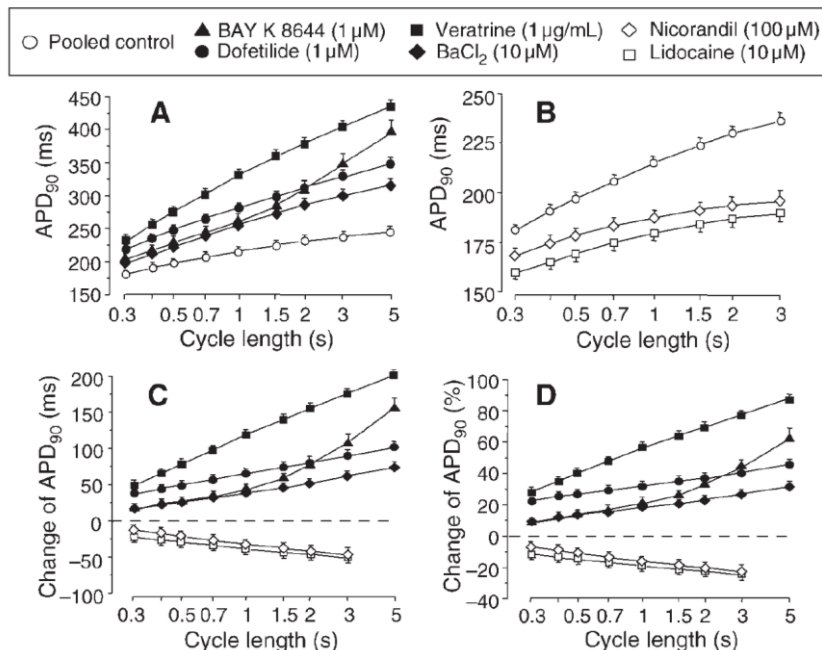
Csoport	Q_{NISO} (pC)	Q_{CHROMA} (pC)	APD_{90} (ms)	Plató magasság (mV)
Kis ionáram (n=5)	-18.8±3.2	6.1±2.4	323.2±42.9	99.5±3.2
Nagy ionáram (n=5)	-64.7±10.1 ***	36.3±13.5 ***	338.4±59.3 n.s.	101.8±2.9 n.s.

Minthogy adott sejtkapacitás esetén ugyanolyan, vagy hasonló AP-t ugyanakkora nettó áram tud csak kialakítani, feltételeznünk kell, hogy ha az egyes sejtekben a depolarizáló áramok nagyok, akkor a repolarizáló áramoknak – ezt kompenzálendő – ugyancsak nagyoknak kell lenniük. Az elemzések során erős korrelációt találtunk az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} által szállított töltésmennyiségek között (Q_{NISO} és Q_{CHROMA}). A szoros korreláció mellett figyelemreméltó az is, hogy a két elemzésbe bevont áram nagysága az egyes sejtekben igen széles skálán szóródott; a legnagyobb mért érték mintegy tízszerese volt a legkisebbnek. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy ugyanazon szívizmon belül a munkaizomsejtek hasonló AP-ket nagyon különböző áramsűrűséggel is létrehozhatnak. Ennek az inhomogenitásnak az élettani és klinikai következményei egyenlőre nem világosak.

Olyan közleményről, amely az ionáramok ilyen nagyfokú sejt-sejt közötti variabilitásáról számol be, jelenleg nem tudunk. A sejtlelettan, sejtbológia egyéb területeiről azonban számos példát ismerünk arra, hogy genetikailag identikus sejtek azonos körülmények között tenyésztve jelentős variabilitást mutatnak. Egy tanulmányban 2500 GFP jelölt fehérje sejtben belüli koncentrációjának vizsgálatakor *Saccharomyces cerevisiae*-ben azt találták, hogy a koncentrációk lognormális eloszlást mutattak [123]. Több olyan közleményt ismerünk, ahol a T-sejt aktiváció, apoptózis, vagy fehérje expresszió funkcionális paramétereit vizsgálva az átlag/standard deviáció viszonya 0.1-0.6 között változott [124-126]. Emlékeztetőül jegyezném meg, hogy esetünkben ez a viszony 0.5 volt. Napjaink elektrofiziológusai úgy tekintenek a varianciára, mint a méréseket terhelő, elkerülhetetlen zavaró tényezőre, adott esetben a mérések minőségét jellemző mutatóra. Egyre többször találkozunk azonban a jelenség olyan megközelítésével, hogy a variancia a vizsgált populációra jellemző biológiai információt hordozhat és funkcionális jelentőséggel bírhat, amelynek tanulmányozására lenne szükség [127-130].

6.4.1.6. A fordított frekvencia függés jelenségének vizsgálata

A különböző csatornagátlók, illetve aktivátorok esetén ismert, hogy az AP különböző paramétereire (alapértelmezésben a hosszára) gyakorolt szerhatás erőssége függ a szív működési frekvenciájától. Ezen frekvenciafüggő hatások közül a legismertebb az III-as osztályba tartozó antiaritmiás szerek fordított frekvencia függő (a továbbiakban FFF) hatása. A jelenség régóta ismert, de pontos mechanizmusa mindmáig nem tisztázott [118, 131]. Az AP és az ionáramok közötti koordinációra irányuló munkánk során adataink abba az irányba mutattak, hogy a FFF hatás egyik lehetséges tényezője lehet az AP hossza és a membránáramok közötti kapcsolat. Feltételeztük, hogy a FFF hatás minden olyan fajban jelen van, ahol az AP hossz – frekvencia összefüggés negatív (vagy fordított). A hipotézis tesztelésére különböző hatásmechanizmusú csatornákra ható szerek Az AP hosszára (a továbbiakban APD-re) gyakorolt hatását



29. ábra. Hat különböző támadáspontú, ioncsatornára ható szer hatása kutya szívizom AP hosszára

A és B: Az AP hosszának frekvenciafüggése a vizsgált szerek estében kamrai munkaizomzaton (A) és Purkinje preparátumon (B).

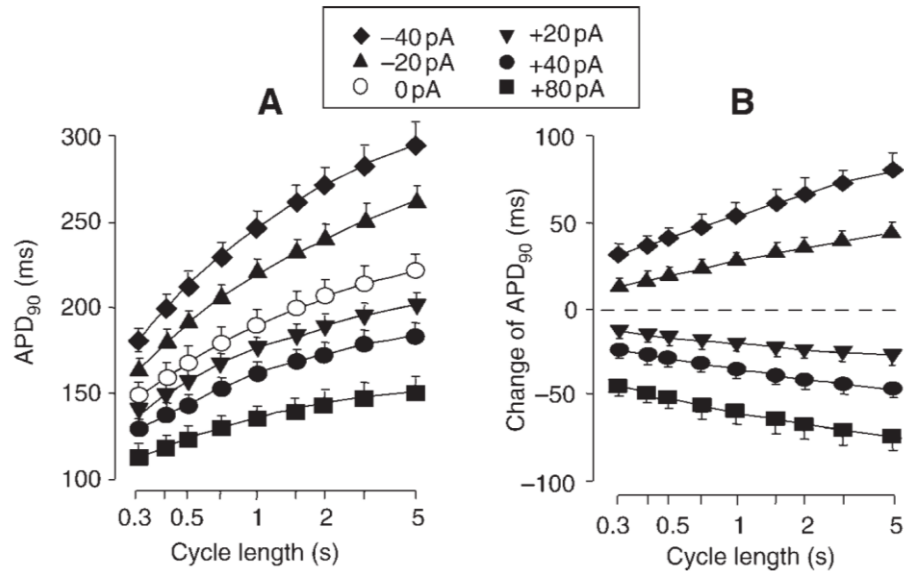
C és D: Az AP hosszában kiváltott változás frekvenciafüggése munkaizomzaton (C) és Purkinje preparátumon (D).

Megfigyelhető, hogy bár eltérő mértékben és irányban, de valamennyi hatás frekvenciafüggő.

elemztük. Azt kívántuk megmutatni, hogy a FFF hatás minden szer esetében jelentkezik, annak hatásmechanizmusától függetlenül.

Az első lépésben hat ismert szívhatású szer APD-re gyakorolt hatásának frekvenciafüggését mértük meg 0.2 – 3 Hz tartományban (29. ábra). A méréseket hegyes elektróddal végeztük multicelluláris preparátumon a sejtek dialízisének megelőzése érdekében. A vizsgált szerek közül a BAY K8644 $I_{Ca,L}$ aktivátor, a Dofetilid I_{Kr} gátló, a Veratrin I_{Na} aktivátor, a BaCl₂ I_{K1} gátló, a Nicorandil $I_{K(ATP)}$ aktivátor, a Lidocain pedig I_{Na} gátló; elmondhatjuk tehát, hogy minden szer másféle hatást fejt ki a szívizomsejtek ionáramain. Adataink egyértelműen igazolták, hogy ezek a különböző támadáspontú szerek minden esetben frekvenciafüggő módon fejtették ki hatásukat az APD-re, bár a Nicorandil és a Lidocain hatása egyenes arányban állt az ingerlési frekvenciával.

A hipotézis következő tesztjeként egy olyan beavatkozás hatásának frekvenciafüggését kívántuk tesztelni amely nem egyetlen ioncsatorna működését módosítja, hanem az AP alatti valamennyi ionáramot valami módon modulálja. Ezért megvizsgáltuk a tonizáló áram által kiváltott APD nyújtó/rövidítő hatás frekvenciafüggését. A kísérletek során a korábban is alkalmazott frekvenciatartományban mértük az



30. ábra. Tonizáló áram hatása az AP hosszának frekvenciafüggésére.

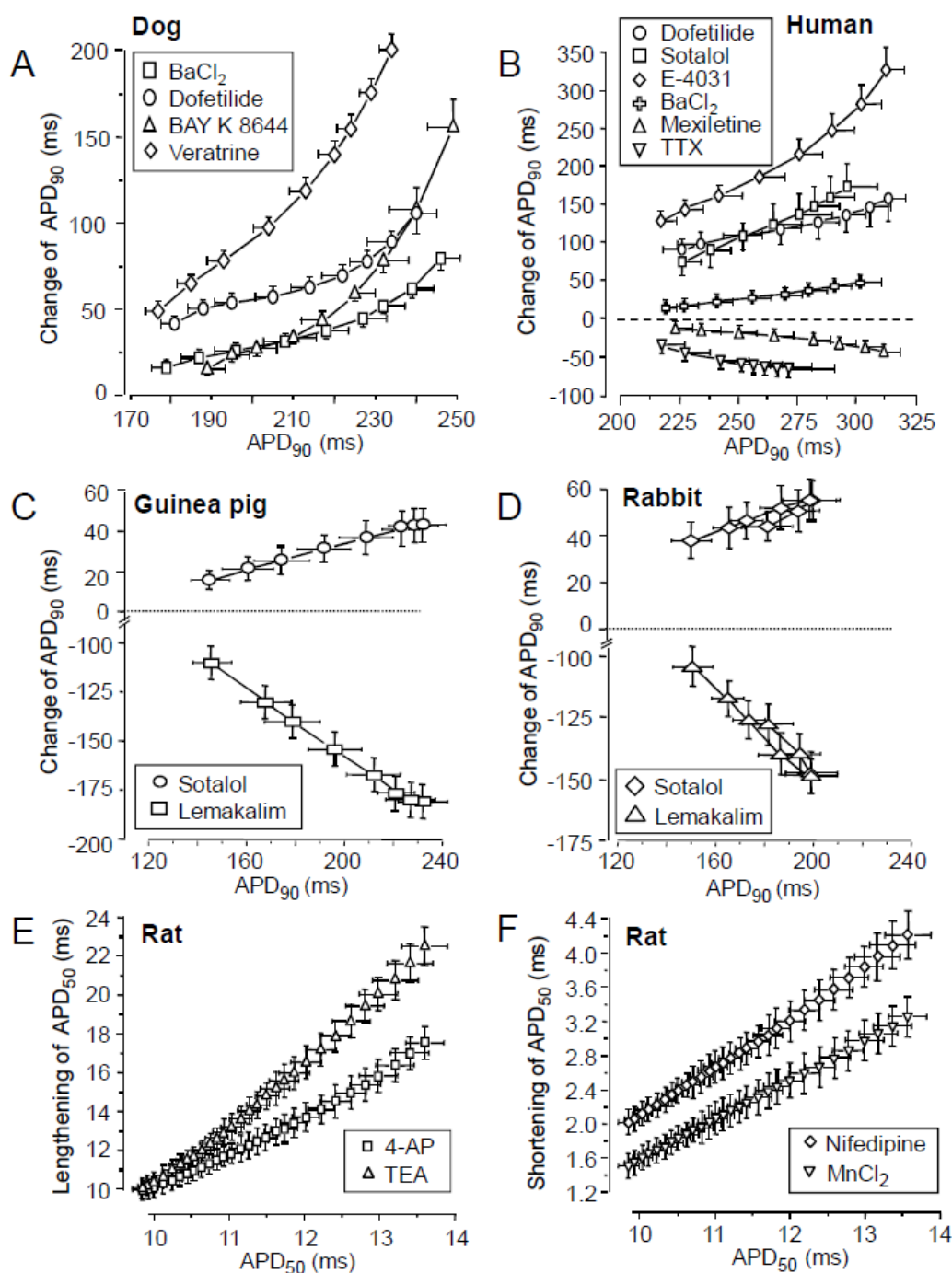
A: Az AP hosszának értékei a vizsgált frekvenciatartományban különböző tonizáló áramok esetén.

B: Az AP hosszában megfigyelt frekvenciafüggő változások (hosszabbodás, rövidülés) az előző panel adatai alapján.

Valamennyi megfigyelt változás monoton frekvenciafüggést mutat.

APD-t, miközben az elektródon keresztül teljes AP alatt tonizáló áramot injektáltunk a preparátumba. A tonizáló áram hatását a -40 - +80 pA tartományban 20 pA-es lépésközökkel teszteltük (30. ábra). Hipotézisünknek megfelelően a tonizáló áram APD-re gyakorolt hatása is frekvenciafüggést mutatott.

A FFF hatások magyarázata e jelenleg elfogadott elméletek szerint a gátlószér és a csatorna közötti interakció frekvenciafüggésében keresendő [119, 132, 133]. A probléma ezekkel a magyarázatokkal az, hogy a drog-csatorna interakció a legtöbb esetben direkt frekvenciafüggő hatást mutat, ennél fogva a FFF hatásokért nem lehet felelős. További nehézséget jelent a megfelelő elmélet megalkotásában, hogy azok nagyrészt olyan mérésekre alapultak, ahol az AP mérés kis ellenállású patch pipettával történt amikor a sejtet a pipetta oldat dializálja. A mi méréseink hegyes mikroelektroddal készültek, ami lényegesen nagyobb mértékben őrzi meg a mért sejt intracelluláris terének integritását. Méréseink alapján semmiképpen nem állíthatjuk, hogy a FFF hatások létrejöttében a drog-csatorna interakció semmiféle szerepet nem játszik. Csupán azt a következtetést kívánjuk levonni, hogy adataink szerint a FFF hatások kialakításában egy olyan tényező is jelen van, amit a korábbi elméletek megalkotásakor nem vettek figyelembe. Nevezetesen, hogy a frekvencia által meghatározott AP hosszának alapvető szerepe van a szívre ható szer hatáserősségének meghatározásában. A jelenség egy nagyon egyszerű, szinte geometriai



31. ábra. Az ioncsatornákra ható szerek APD hossza gyakorolt hatásának mértéke az AP eredeti hosszától függ

A több fajon, különböző támadáspontú szerekkel végzett mérések egyöntetűen mutatják, hogy valamennyi szer esetében az APD-ben bekövetkező változás mértéke az AP kezdeti hosszával mutat korrelációt.

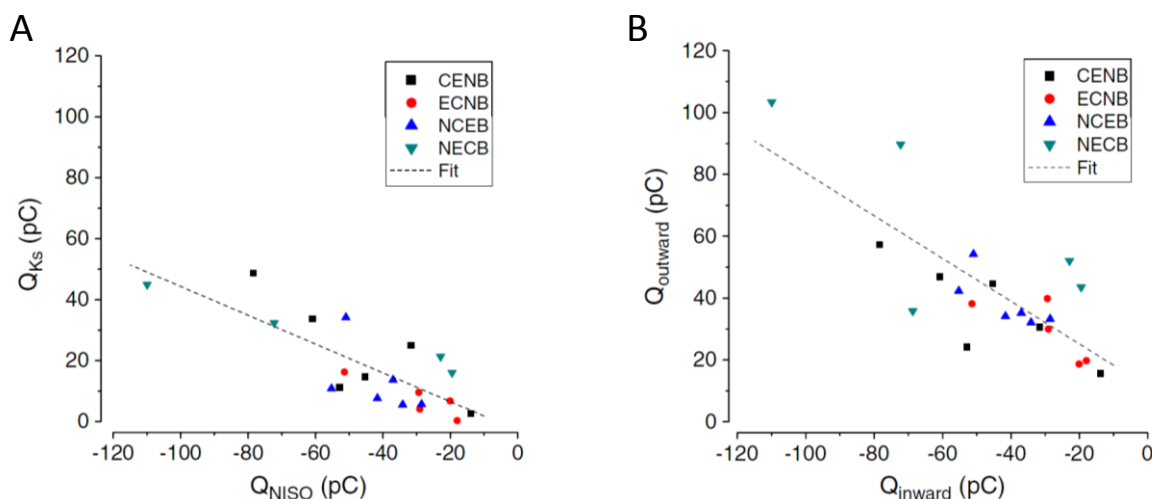
viszonnyal írható le. Hosszabb AP-ken az APD nyújtó vagy rövidítő hatások erősek lesznek, rövidebb AP-ken pedig gyengék.

A következő lépésben az általunk javasolt magyarázat több fajra történő kiterjesztése érdekében öt állatfajon ismételtük meg a korábbi vizsgálatot különféle támadáspontú csatorna gátlókkal és aktivátorokkal. A hipotézis további tesztelése céljából az adatokat ezúttal nem az ingerlési frekvencia, hanem az APD alapján elemeztük. Azt vizsgáltuk, hogy az APD értékei korrelálnak-e az ioncsatornákra ható szerek hatásának mértékével. Az előzőekkel egybevégtően, megfigyeléseink minden faj esetében megerősítették hipotézisünket, mely szerint a kontroll viszonyok között mért APD határozza meg az AP hosszában bekövetkező változás mértékét (31. ábra). Az arányosság lehet egyenes, vagy fordított, de a hosszabb AP-ken minden esetben nagyobb változásokat figyelhetünk meg, a rövidebbeken pedig kisebbeket.

6.4.2. Ionáramok közötti koordináció

6.4.2.1. A depolarizáló és repolarizáló áramok koordinációja tengeri malac kamrai izomsejtjein

Élettani viszonyok között, a szív ciklus során a depolarizáló és repolarizáló áramoknak egyensúlyban kell lenniük. Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technikával ugyanazon sejtek négy áramát ($I_{Ca,L}$, I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) rögzítettük és azt vizsgáltuk, hogy bármely áram pár, vagy az áramok csoportjainak amplitúdója, vagy egyéb paraméterei között felismerhető-e bármilyen összehangolás, együttműködés. Meglepő módon az áramok páronként történő elemzése során csupán az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} között figyeltünk meg értékelhető kapcsolatot (32. ábra). A két áram által az AP alatt szállított töltésmennyiség jó korrelációt mutatott ($r=0.79$). Ugyancsak figyeltünk meg az AP alatt elmozduló teljes töltésmennyiségek között (Q_{inward} versus $Q_{outward}$) ahol a korrelációs együtthatót 0.78-nak találtuk. Ezekből a megfigyelésekből két érdekes következtetést vonhatunk le. Egyrészt, ahogy a korábbi fejezetekben már érintettem, a késői egyenirányító kálium áram többek által megkérdőjelezett szerepe kapcsán hangsúlyoznunk kell, hogy a mi megfigyeléseink szerint az I_{Ks} a kamrai szívműködés fontos repolarizáló árama. Ezen túlmenően az $I_{Ca,L}$ -al mutatott korrelációja miatt még azt is valószínűsíthetjük, hogy az I_{Ks} jelentős szerepet tölt be az AP adaptációjában. Másrészt, mivel a másik két repolarizáló áram esetében nem látunk semmiféle korrelációt, valószínűsíthetjük, hogy ezeknek a repolarizációban való részesedése nem szimpla „arányos teherviselés” alapján történik, hanem valamilyen, mindmáig fel nem tárt megosztás alapján. Valamilyen megosztásunk léteznie kell, hiszen a kifelé és befelé elmozduló töltések mennyisége azonos.

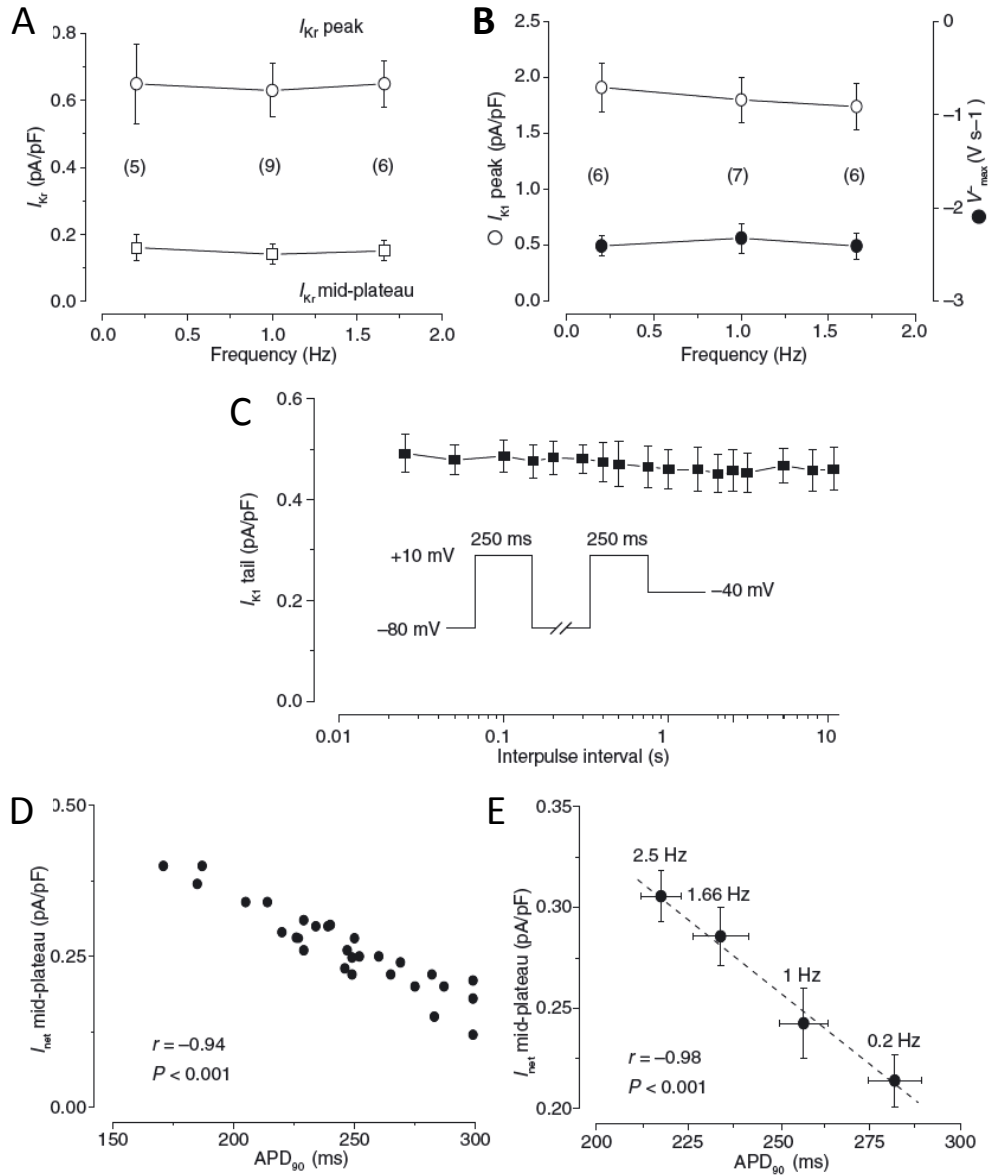


32. ábra. Korreláció az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} (A), valamint az AP alatt kifelé és befelé mozgó teljes töltésmennyiség (B) között AP Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp módszerrel vizsgálva. A rövidítések az gátlószerek alkalmazási sorrendjét jelölik az I. Táblázatnak megfelelően.

6.4.2.2. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggetlen áramok

Minthogy az AP frekvenciafüggő tulajdonságai az ionáramok frekvenciafüggő tulajdonságaiból származhatnak, kutya kamrai szívizomsejteken megvizsgáltuk az AP plató magasságát és hosszát meghatározó két kálium áram frekvenciafüggő sajátosságait 0.2 és 1.66 Hz között (33. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy az áramok nagysága csakúgy mint az AP maximális repolarizációs sebessége nem mutatott frekvenciafüggést.

Míg az I_{K1} esetében a kísérleti eredményeink megfelelnek a várakozásoknak, az I_{Kr} általunk megfigyelt frekvenciafüggetlensége ellentétes az áram lassú inaktivációja alapján feltételezett tulajdonságaival [134]. Minthogy az I_{Kr} kutyában igen lassú deaktivációt mutat, magas frekvenciákon az áram akkumulációja volna várható. A megfigyelések megerősítése céljából páros pulzussal is megmértük az I_{Kr} farokáramának nagyságát széles intervallumtartományban. Ahogy a xx. ábra C paneljén látható, az áram amplitúdója nem mutatott intervallumfüggést, ami egybevág az előzőleg bemutatottakkal. Korábban bemutatott eredményeink szerint (12. és 13. ábra) nem mutatható ki korreláció a AP hossza és az I_{Kr} ,



33. ábra. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggő sajátosságai

Az I_{Kr} csúcsának és plató alatti nagyságának (A) valamint az I_{K1} csúcsának és az AP maximális repolarizációs sebességének (B) frekvenciafüggése. Látható, hogy a vizsgált paraméterek frekvenciafüggetlenek. Amennyiben az I_{Kr} -t páros pulzussal váltjuk ki (C), a második csúcs amplitúdója nem mutat intervallumfüggést. Ugyanakkor, az AP platója alatti nettó (I_{net}) áram szoros korrelációt mutat az AP hosszával egy adott frekvencián belül mérve (D) vagy különböző frekvenciákon meghatározva.

illetve I_{K1} nagysága között. Ezek az adatok azt mutatják, hogy ennek a két áramnak az esetében az aktiválódásban a feszültség játssza az elsődleges szerepet, az idő kevésbé fontos.

Adataink arra utalnak, hogy a két áram között feltételezhető egyfajta összjáték. Amennyiben az egyik áram amplitúdója megnövekszik és ezzel a repolarizáció sebessége felgyorsulna, a membránpotenciál gyorsabban éri el az alacsonyabb feszültségértékeket és ezzel a töltéshordozó K^+ -ra ható hajtóerő, valamint a másik áram aktivációját (a sajátjával együtt) lecsökkenti. Ez a fajta önszabályozó rendszer alkalmas lehet a terminális repolarizáció frekvenciától független sebességen tartására a B panelen mutatott megfigyeléseinknek megfelelően. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy az I_{K1} által szállított töltésmennyiség mintegy háromszorosa az I_{Kr} által szállítottaknak, tehát a terminális repolarizáció beállításában az I_{K1} a domináns áram. Hasonló következtetésekre jutottak Gintant és *mtsai* hagyományos voltage clamp kísérletek adataiból [135].

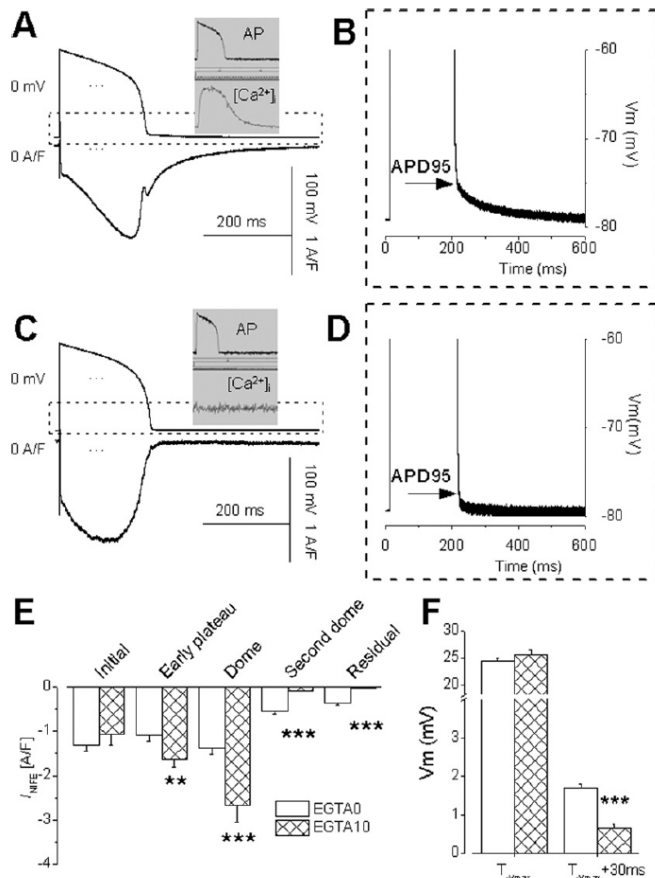
6.4.2.3. Az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} koordinációja

A szív ciklus során az $I_{Ca,L}$ -on keresztül a sejtekbe belépő Ca^{2+} -k eltávolításában központi szerepe van Na^+/Ca^{2+} cseremechanizmusnak, ami felveti működésük koordinációjának lehetőségét. AP Clamp technika alkalmazásával megkíséreltük ezen áramok együttes meghatározását a közöttük lévő kapcsolat megismerése céljából.

Amennyiben az $I_{Ca,L}$ -t Nifedipin érzékeny áramként mérjük meg az AP alatt olyan pipetta oldattal amely nem tartalmaz kalcium puffert, a kapott áramprofil az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} kompozit árama lesz. Ilyen körülmények között a két áram elválaszthatatlan egymástól, ugyanis a belépő Ca^{2+} -k aktiválják az I_{NCX} -et és a voltage clamp technika alapelvéből következően az erősítőnk a két áram összegét fogja mérni (34. ábra, A panel). Ha azonban a mérést olyan körülmények között ismétljük meg amikor a pipetta oldat 10 mM EGTA-t tartalmaz, az I_{NCX} nem aktiválódik, ugyanis az EGTA a Ca^{2+} -kat kelálja (34. ábra, C panel). Figyeljük meg, hogy az A panelen jól látható a kalcium tranziens, a C panelen azonban nem ábrázolódik (szürke háttérű beszúrások). A két áramgörbét összehasonlítva látható, hogy amikor EGTA hiányában mértük a Nifedipin érzékeny áramot, az áramgörbe messze túlért az AP-n és leszálló ágán egy második csúcs jelent meg. Az áramgörbe ezen szakaszát az I_{NCX} hozza létre. Megfigyeltük, hogy amikor az I_{NCX} jelen van, az AP terminális repolarizációjának végén egy kis amplitúdójú, de lassú lecsengésű utópotenciál figyelhető meg (34. ábra, B, D és F panelek). Ezt, a korábban még fel nem ismert utópotenciált az elektrogén I_{NCX} hozza létre. Mivel nagysága csupán néhány millivolt és teljes terjedelmében az APD_{95} szintje alatt van, a hagyományos AP elemzések során nem kerülhetett felismerésre.

34. ábra. I_{NCX} és $I_{Ca,L}$ közös profilja tengeri malac AP alatt.

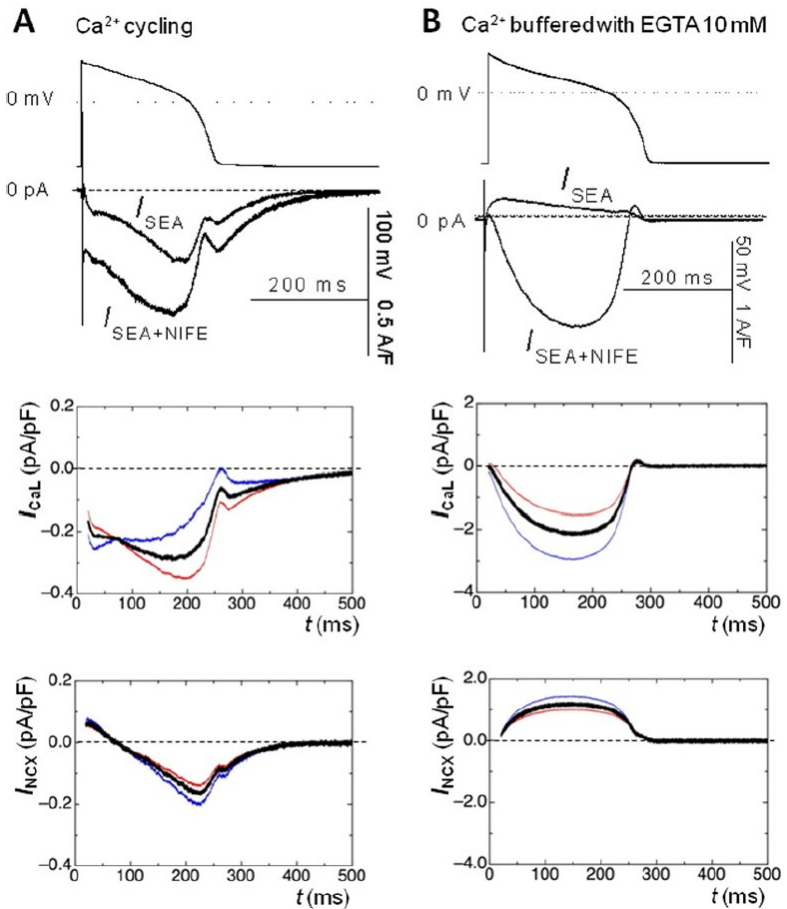
Ha a Nifedipin érzékeny áramot intracelluláris Ca^{2+} puffer nélkül mérjük (A panel) a Ca^{2+} tranziens jelenlétében az I_{NCX} és $I_{Ca,L}$ kompozit áramát rögzíthetjük. Ilyenkor az AP végén kis utópotenciál jelenik meg (B panel). 10 mM EGTA (Ca^{2+} puffer) jelenlétében az I_{NCX} nincs jelen a Nifedipin érzékeny áramban, ugyanis Ca^{2+} tranziens hiányában (szürke panel) az áram nem aktiválódik (C panel). Ilyenkor az AP-n nem láthatjuk a jellegzetes utópotenciált sem (D panel). Az EGTA hatására a kompozit áram $I_{Ca,L}$ által dominált szakaszai növekednek meg és eltűnik a második csúcs az azt követő zakasszal amit az I_{NCX} -nek tulajdonítunk (E panel). Az EGTA nem változtatja meg a membránpotenciál értékét az AP maximális repolarizációjának időpontjában (T_{Vmax}), de jelentősen csökkenti az AP-t követő utópotenciál értékét ($T_{Vmax}+30ms$), amelyet az I_{NCX} hozott létre (F panel).



Farmakológiai módszerek és modellezés kombinációjával megkísérelhetjük a két áram szétválasztását. A SEA-0400 nevű gátlószer az I_{NCX} -et részlegesen, dózisfüggő módon gátolja. Ha tehát meghatározzuk a SEA-0400 érzékeny áramot intracelluláris Ca^{2+} puffer jelenlétében és hiányában, az adatokból az I_{NCX} AP alatti lefutását meghatározhatjuk. Az ily módon különválasztott $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} áramprofilokat a 35. ábrán mutatom be. Látható, hogy az $I_{Ca,L}$ amplitúdója intracelluláris EGTA jelenlétében jelentősen megnő a megszűnt kalcium függő inaktiváció miatt. EGTA mentes közegben mérve az $I_{Ca,L}$ lefutása lényegében megfelel az EGTA jelenlétében mértnek, az AP végén található másodlagos csúcs kivételével. Mivel ilyen csúcsot egyetlen AP Clamp-pel rögzített áramgörbén sem látunk, valószínű, hogy ez modellezési műtermék. Meglepő felfedezéseket tehetünk ugyanakkor az I_{NCX} görbék vizsgálatakor. Elsősorban is feltűnő, hogy az elméleti megfontolásokkal szemben, a görbe korai szakaszán található outward komponens mérete nagyon kicsi és az inward csúcs is a várt érték alatt van [14, 136]. További nem várt megfigyelés, hogy EGTA jelenlétében az I_{NCX} teljes egészében outward irányú. Megfelel azonban a várakozásoknak, hogy a csúcsot a plató végén találjuk, a terminális repolarizáció közelében, ahol az EAD-ok a leggyakrabban jelentkeznek. Az áramgörbék lefutásából megállapítható, hogy míg az AP kezdeti

35. ábra. Az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} szétválasztása matematikai rekonstrukcióval EGTA mentes (A oszlop) és 10 mM EGTA-t (B oszlop) tartalmazó közegben.

Az első sor mutatja a bemeneti adatként használt SEA-0400 és SEA-0400 + Nifedipin jelenlétében mért áramokat. A SEA-0400 az alkalmazott $3 \mu\text{M}$ koncentrációban részleges I_{NCX} gátlást okoz. Ezt az hatást felfaktorozva és a SEA-0400+Nifedipine áram görbéből kivonva az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} rekonstruálhatóak (fekete vonal). A piros vonal egy olyan rekonstrukció eredményét mutatja, amikor az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} közötti nincs csatolás. Kék vonal jelöli az 1:1 csatolásos modell által szolgáltatott görbét.



szakaszán és a plató alatt az $I_{Ca,L}$ a domináns áram, a plató végére már felnő az I_{NCX} és átveszi a domináns szerepet.

6.5. Az SR elemi kalciumfelszabadulási jelenségeinek koordinációja

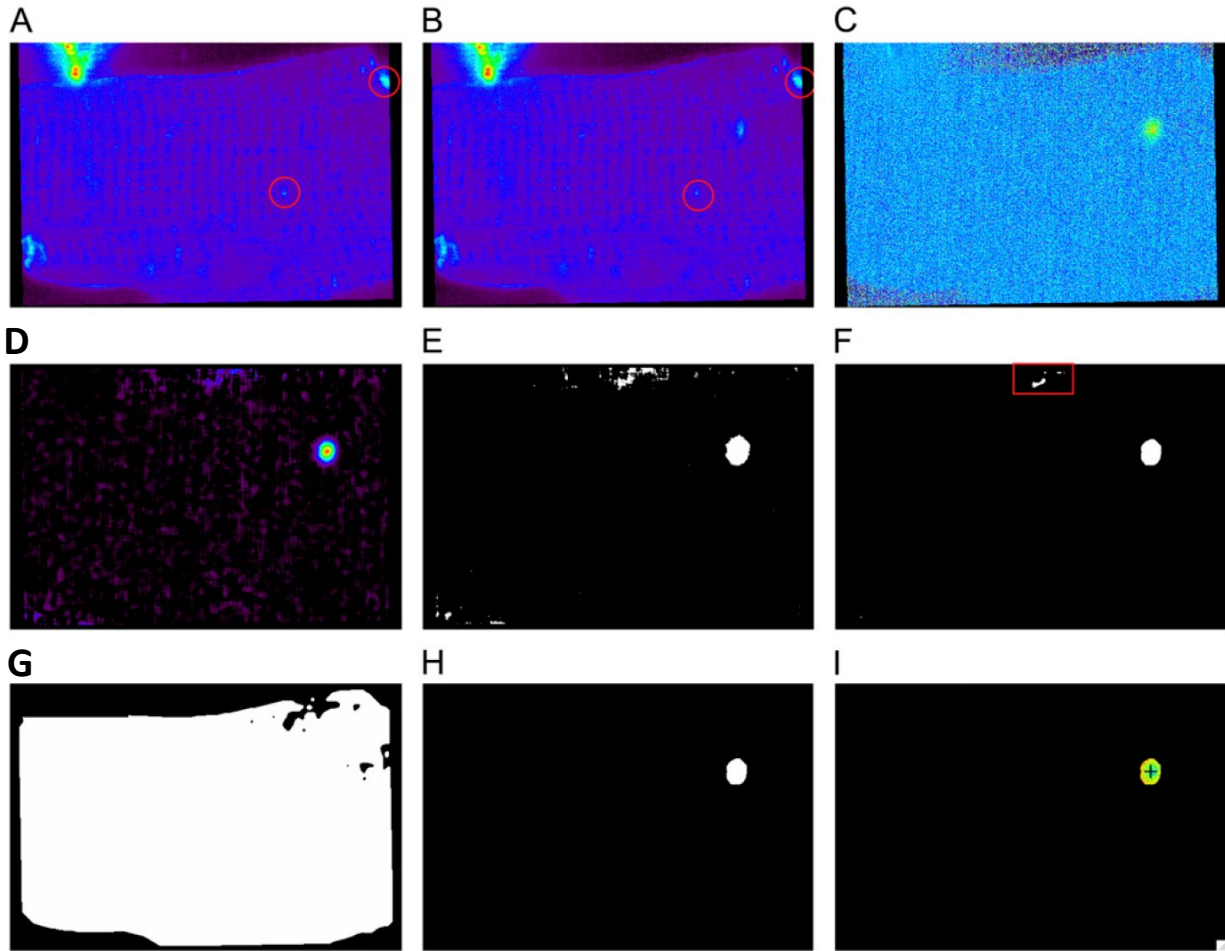
A disszertáció eddigi szakaszában az ionáramok koordinációjának problémájával foglalkoztam. A kérdéskör kiterjesztéseként azonban indokolt azt is megvizsgálni, hogy a sejt plazma kalcium koncentrációjának szabályozásában felismerhetők-e koordinációs jelenségek. A kamrai szívizomsejtek membránjában található ioncsatornák működésének szabályozásában a kalcium ionok központi szerepe hosszú ideje ismert és intenzív kutatás tárgya. Általánosságban elmondható, hogy napjainkig a legtöbb kamrai ionáram esetében kimutattak valamilyen fokú kalcium érzékenységet[51]. A kamrai sejtek plazmájában a kalcium koncentráció a szív ciklussal együtt változik, ami felveti annak lehetőségét, hogy a kalcium ionok mozgatásáért felelős mechanizmusok között is kimutathatók koordinációs jelenségek. A kérdés megközelítésének első lépéseként az SR-ből történő kalcium felszabadulás elemi jelenségeit, a

sparkokat tanulmányoztuk. A sparkok közötti kommunikáció jelensége már hosszú ideje ismert [83, 86-88]. A következőkben ismertetendő munkánk célja az volt, hogy statisztikai módszerekkel jellemezzük a sparkok közötti kommunikációt, vagyis kvantitatív leírását adjuk a feltételezett koordinációnak. Ehhez a vizsgálathoz nagyszámú sparkot kellett megvizsgálnunk. A nagy adatmennyiség indokolta, hogy a sparkok felismerését és statisztikai elemzését automatizáljuk.

6.5.1. Új, automatizált eljárás a sparkok felismerésére

A sparkok azonosítása hagyományosan a mikroszkópos felvételek megtekintésével történik, majd ezt követően a felvillanásokat tartalmazó képkockákat elemzik. Munkánk során patkány kamrai szívizom sejteken megfigyelhető sparkokat vizsgáltunk (lásd Módszerek fejezet). A sejtekről 200 darab 2D képkockát (512x512 pixel, 12 bites pontfeloldás) tartalmazó sorozatot készítettünk, amelyen az egyes felvételek 12 ms-os időközökben követték egymást. A továbbiakban a „sorozat” és „képsorozat” olyan 200 kockából álló felvételt jelent, amelyen egyetlen sejt fluorescens képét (sparkjait) rögzítettük. Az automatikus felismerő algoritmus/program számára elsőként ki kellett dolgozni és matematikailag megfogalmazni egy olyan feltételrendszert, amely segítségével a szívizomsejtekről készült fluorescens mikroszkópos felvételeken a sparkok egyértelműen azonosíthatóak voltak. Ezt követően el kellett készítenünk azt a programot, amely a digitális felvételeket beolvasta és elemezte. A program írására IDL nyelvet választottunk (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO). A program beolvasta a képkockákat, majd a sparkok felismerése céljából minden egyes képpont intenzitás értékét összehasonlította egyrészt az azonos képkockán található többi képpont, másrészt az egymást követő képkockák azonos koordinátájú képpontjainak intenzitás értékeivel. A feldolgozott adatmennyiséget jól jellemzi, hogy az egyetlen sejtről készült, 200 képkockát tartalmazó felvételsorozat tárigénye 100 MByte nagyságú volt.

A sparkok automatizált felismeréséhez a képkockák azon képpontjait kellett felismerni, melyek intenzitása az egymást követő felvételeken megnövekszik, majd egy csúcspont elérése után lecsökken. Mivel az egyes sejtek esetében a háttér intenzitása és a sejtek kalcium érzékeny festékkel történő individuális töltődése miatti fluorescens intenzitásértékek igen széles határok között változtak, a kritériumok numerikus paramétereinek mindig az aktuális felvételek intenzitás értékeihez kellett alkalmazkodni. Emiatt a sparkok azonosítása egy többlépcsős folyamat volt. A folyamatot a 36. ábra mutatja egy reprezentatív sejtről készült sorozat segítségével.



36. ábra. A sparkok automatikus azonosításának lépései.

- A. Normalizálásra használt képkocka. A fényes területeket, melyek egyaránt lehetnek potenciális sparkok, vagy műtermékek, piros karika jelzi.
- B. A képsorozat hatodik kockája, amelyen a ugyanazok a fényes területek láthatóak mint a normalizálásra használt felvételen (piros körök).
- C. Normalizált képkocka (B/A). Jól látható, hogy a normalizálást követően csak az időben nem állandó fényes területek maradnak meg.
- D. Az ötödik és hatodik normalizált kockák különbsége (differenciálás).
- E. Bináris képkocka a küszöbérték feletti pixelek 1-re és a küszöbérték alattiak 0-ra állítását követően.
- F. A kis területű fényes foltok eltávolítása a képekről digitális szűrés segítségével.
- G. A sejt alakjának meghatározását követően kapott bináris maszk. Az alacsony intenzitású területeket az algoritmus nem képes azonosítani, de ezek nagysága jelentéktelen a sejt teljes területéhez képest.
- H. Az F és G paneleken látható kockák (bináris képek) szorzása után kapott bináris kép. A fehér folt a potenciális spark.
- I. A B és H paneleken látható képkockák szorzataként kapott 12-bites kép a sparkkal. A kereszt a tömegközéppontot jelzi

6.5.1.1. Első lépés: a felvételek normalizálása

Ennek a feldolgozási lépésnek az volt a célja, hogy a sejtek fluorescens intenzitásának egyedi ingadozásából adódó különbségeket megszüntesse. Ehhez a feldolgozás során minden képsorozatból kiválasztottunk egy képkockát, ez lett az adott sorozat normalizáló képkockája. A kiválasztás legfontosabb szempontja az volt, hogy a képen minél kevesebb szabad szemmel felismerhető spark legyen. A normalizálási lépésben a képsorozat (például a 36 ábra, B panel) minden egyes kockája minden egyes képpontjának intenzitás értékét elosztottuk a normalizáló kocka azonos koordinátájú képpontjának intenzitás értékével (36 ábra, A panel). A gyakorlatban ez úgy történt, hogy a nevezőt (tehát a normalizáló képkocka adott pontjának intenzitás értékét) megnöveltük eggyel a nullával való osztás elkerülése érdekében. Mivel az átlagos intenzitásérték 500-1000 közé esett, ez a lépés a hányados értékét jelentősen nem befolyásolta. A hányados képzését követően az egyes képkockákon 9x9 pixeles mezőre alapuló kétdimenziós simítást végeztünk (boxcar technika). Mivel egy képpont mérete 0.12 μm , a szűrés következtében az 1 μm -nél kisebb átmérőjű fluorescens jelek intenzitás hányadosa jelentősen lecsökkent, kiszűrve ezzel a kisebb műtermékeket (a sparkok mérete 1 μm -nél mindig nagyobb).

6.5.1.2. Második lépés: Differenciálás és küszöb meghatározás

Ennek a lépésnek a célja az időben konstans intenzitású területek eltávolítása a felvételekből. Ily módon például azokat az álpozitív jeleket és műtermékeket is eliminálhatjuk, amelyek intenzitás érték és méret alapján tévesen spark-ként azonosíthatunk. A differenciálás során minden képkockából kivonjuk az időben következő képkockát pixelről pixelre a $D_k = N_k - N_{k-1}$ függvénynek megfelelően (36 ábra, D panel). Az így kapott képkocka pontjainak intenzitás értékét ezt követően egységesen egyre állítottuk, ha az nullánál nagyobb volt. Amennyiben az érték nulla volt, azt változatlanul hagytuk. Ily módon egy bináris képet kaptunk, ahol nulla volt azon képpontok intenzitás értéke, amelyek az őket időben követő képkockán nem mutattak változást, míg az egyes szám arra utalt, hogy a pixel intenzitás értéke a következő képkockán megnőtt (36 ábra, E panel). Ezt követően egy szűrést alkalmaztunk, amely eliminálta mindazon egyes értékű pixeleket, amelyek valamennyi szomszédja nulla volt (36. ábra, F panel). Ezzel a zajszűrő lépéssel nagyszámú álpozitív pixelt távolítottunk el azon az alapon, hogy a sparkok mérete meghaladja az 1 μm -t (egy pixel mérete 0.12 μm). Ugyanez a lépés megelőzi a sparkok peremén a zaj miatt létrejövő izolált képpontok önálló spark-ként történő azonosítását is.

6.5.1.3. Harmadik lépés: a sejt határainak automatikus meghatározása

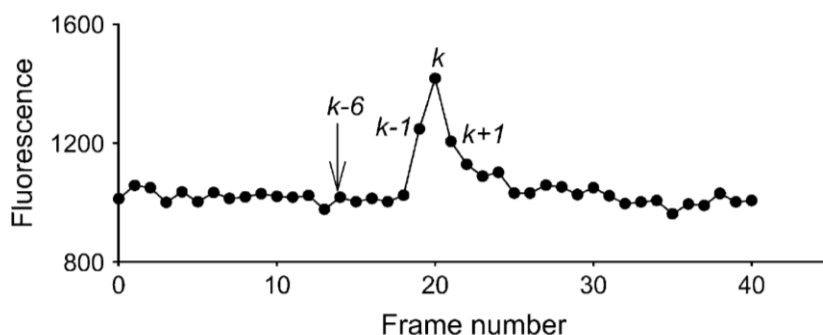
A sparkok statisztikai feldolgozásához meg kell határozni a mérésbe bevont sejt határait, majd ennek segítségével az alapterületét. Mivel a sejt plazma fluoreszcencia intenzitása jelentősen meghaladja a háttérét, a normalizáló képkocka pixeljeinek medián értéke fölötti intenzitás értékeket a sejthez tartozóként kezeltük, az az alattiakat pedig háttérnek tekintettük. Ezzel a lépéssel az előző pontban kapott bináris képhez hasonlóan ismét egy bináris képet generáltunk, de ez a kép most nem az időben változó intenzitású pixeleket mutatta, hanem a sejtet. Az így kapott képet az előző pontban tárgyalt szűrővel szűrve eltávolítottuk a zaj következtében megjelenő, egy pixelre korlátozódó intenzitás ingadozásokat (36 ábra, G panel). A képen feltűnik, hogy az automatikusan definiált sejten néhány „lyuk” látható. Mivel ezen lyukak területének összege sosem haladta meg a sejt teljes területének 1-2%-át, az elemzés során ezen „lyukak” feldolgozásáról lemondunk. Az így automatikus felismeréssel kapott sejt maszk alkalmas volt arra, hogy a sejten kívüli fluorescens jeleket nagy biztonsággal kiküszöbölhessük és mindössze 1-2%-al becsülte alul a sejt területét, illetve a sparkok számát.

6.5.1.4. Negyedik lépés: a sparkok helyének azonosítása

A sparkok felismerése a bináris és eredeti képkockák egyszerű pixelenkénti szorzásával történik. A két bináris képkocka nulla értékű pixeljei (akár, mert a sejten kívüli területről van szó, akár mert a pixel intenzitásértéke időben állandó) törlik az eredeti képkockák 12 bites intenzitás értékeit, így végül a képen csak a sparkoknak megfelelő területek maradnak (36 ábra, H panel). A megmaradt területek tömegközéppontja egyszerű algoritmus segítségével meghatározható, így végül egyetlen x, y koordinátával jellemezhető pontot kapunk, amely a továbbiakban a spark helye lesz a felvételen (piros kereszt a 36. ábra, I paneljén). Ezek a koordináta párok a spark felismerő algoritmus további lépéseiben kerülnek felhasználásra.

6.5.1.5. Ötödik lépés: Statisztikai szűrés

Az előző fázis olyan területek koordinátáit határozza meg, amelyek intenzitás adatai (amplitúdó, kiterjedés, pixel denzitás) alapján sparkokként azonosíthatóak. Mindazonáltal a fluoreszcencia értékekben bekövetkező növekedés optikai, vagy elektronikus zaj következtében is megjelenhet a felvételeken. Az ilyen *ál-spark* és *valódi spark* elkülönítésére statisztikai szűrőt alkalmaztunk. Ennek a lényege, hogy statisztikai módszerrel döntjük el azt, hogy a 12 bites intenzitásértékeket tartalmazó képsorozat egy adott pontjában bekövetkező intenzitás növekedés nagyobb-e az ugyanazon pont



37. ábra. A statisztikus szűrő működésének elve.

A grafikon minden pontja egy képsorozat (x-tengely) egy-egy képkockáján ugyanazon koordinátájú pont fluoreszcencia intenzitásának értéket mutatja arbitrárius egységekben. A feltételezett spark maximális intenzitás értéke a k -adik képkockán található. A statisztikai feltételeket a k és $k+1$ pontokra vizsgáljuk. A statisztikai szűrő alkalmazása során az intrinsic zaj meghatározása a $k-6..k-2$ pontok alapján történik. A $k-1$ pontot az analízisbe nem vonjuk be a nagy bizonytalansági tényező miatt. *(Részletes magyarázat a szövegben)*

tapasztalati intenzitás ingadozásánál. Ehhez az előzőekben automatikusan detektált felvillanást megelőző öt képkocka segítségével meghatározzuk a vizsgált koordináta 3×3 pixel kiterjedésű környezetében a fluoreszcencia intenzitás átlagát és varianciáját, ahogyan azt a 37 ábra $k-6..k-2$ pontjai mutatják. A $k-1$ pontot nem használjuk, mert az már beleeshet a spark felszálló szárába. Annak valószínűségét, hogy a k -adik képkocka vizsgált pontjának intenzitás értékében bekövetkezett növekedés nagyobb-e a megelőző $k-6..k-2$ szakasz alapján várható statisztikus ingadozásnál, a Student féle t-eloszlás segítségével határozzuk meg. Amennyiben ez a valószínűség kisebb mint $\alpha=0.01$, a fluorescens intenzitás növekedést potenciálisan *valódi spark*-nak tekintjük és folytatjuk további statisztikai elemzését. A statisztikai teszten kihullott intenzitásnövekedések koordinátáit mint *ál-spark*-ot, ejtjük. Ahhoz, hogy az intenzitásnövekedést *valódi spark*-nak tekintsük az szükséges még, hogy a $k+1$ -edik képkockán a vizsgált pixel intenzitásértékének alapértékhez viszonyított emelkedését $\beta=0.025$ -nél kisebb valószínűséggel okozhatja csak a véletlen (ugyancsak a $k-6..k-2$ képkockák alapján meghatározva). Azért szükséges ezen pont esetében kevésbé szigorú feltételt szabni, mert *valódi spark* esetén a fluoreszcencia intenzitás értéke az idő előrehaladtával csökken.

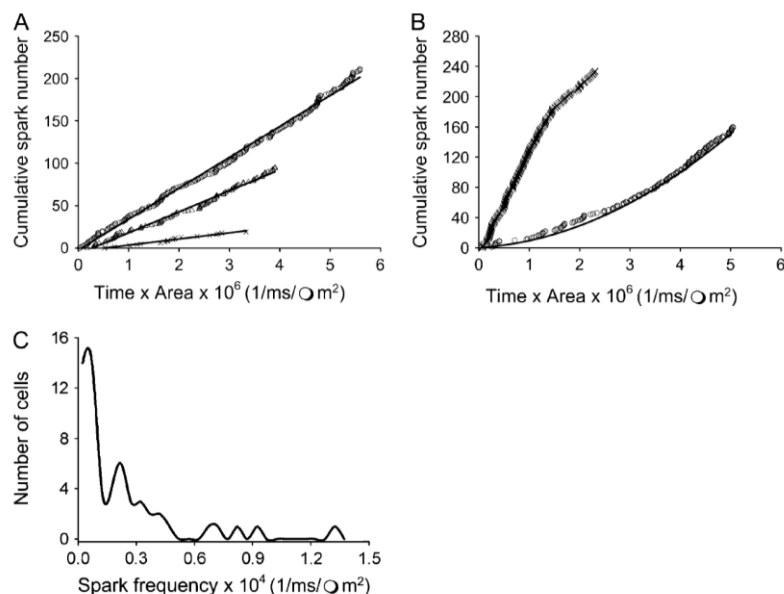
Az általunk kifejlesztett és itt alkalmazott statisztikai szűrőnek igen előnyös tulajdonsága, hogy a feltételeket nem a képkockák teljes területéből határozza meg, hanem kizárólag a feltételezett spark közvetlen környezetéből. Ennek következtében a képkockákon belüli inhomogenitásokra az eljárás nem érzékeny. Továbbá, az algoritmus tartalmaz olyan kritériumokat (dinamika, kiterjedés), ami a sparkokról szerzett korábbi ismereteinkre alapul.

6.5.1.6. Hatodik lépés: a sejtek elforgatása

A sparkok elemzéséhez szükségünk lesz azok térbeli eloszlásának vizsgálatára, melynek megkönnyítése érdekében a felvételeket elforgatjuk oly módon, hogy a sejtek hossz tengelye egységesen a képkockák x tengelyével legyen párhuzamos. Mivel a sparkokat di-8-ANNEPS indikátorral feltöltött sejteken vizsgáljuk, a fluorescens felvételeken a T-tubulusok jól látható harántcsíkolatként felismerhetők. A normalizálási eljárás során egy olyan algoritmust alkalmazunk, amely a képkockákat úgy forgatja el, hogy a harántcsíkolat az Y tengellyel párhuzamos legyen. Az optimális forgatási szöget a normalizáló képkockán azonosítható fluorescens sávok x-tengely menti kiterjedésének minimalizálásával határozzuk meg.

6.5.1.7. A spark felismerő algoritmus/program tesztelése

Annak eldöntésére, hogy az algoritmus megfelelő hatékonysággal ismeri-e fel a sparkokat, nagyszámú képsorozatot elemeztünk hagyományosan (manuális módszerrel) és a program segítségével, majd az így kapott eredményeket összehasonlítottuk. A szabad szemmel felismerhető sparkokat a program már a legkorábbi verzióiban is gyakorlatilag 100% hatékonysággal ismerte fel, ami a kritériumok szerencsés megválasztását jelzi. Ugyanakkor, általában 2-3x annyi sparkot azonosított a felvételeken, mint amennyit szabad szemmel észleltünk. Ezek minden esetben igen halvány sparkok voltak, nagy részüket egyetlen képkocka megtekintésével nem lehetett felismerni. Ha azonban a megjelölt képkockákat nagy sebességgel oda-vissza lejátszottuk (a csillagászatban üstökös keresésre használt eljáráshoz hasonlóan), az azonosított sparkot minden esetben megtaláltuk. Véggkövetkeztetésként tehát megállapíthattuk, hogy a program nemcsak nagy biztonsággal találja meg az emberi szemmel szokásos módon azonosítható sparkokat, de nagy számban talál meg olyanokat is, amelyeket hagyományos módszerrel nem észlelnénk.



38. ábra. A dinamikus spark frekvencia meghatározása a kumulatív spark szám (Y-tengely) és a sejt területe, valamint mérési idő alapján (X-tengely).

A. Reprezentatív példák három különböző spark frekvenciát mutató sejt esetén. Mindhárom sejt esetében a spark frekvencia időben állandó.

B. Példák csökkenő (keresztek) és növekvő (körök) spark frekvenciát mutató sejtekre.

C. A sparkok frekvenciájának eloszlás görbéje a vizsgált populáción. Szembetűnő az erősen aszimmetrikus eloszlásgörbe.

6.5.2. A sparkok tulajdonságai

Az automatikus felismerő algoritmus segítségével 77 sejten rögzített, egyenként 10 másodperc hosszúságú képsorozaton 6670 sparkot azonosítottunk, majd elemeztünk.

6.5.2.1. A dinamikus spark frekvencia meghatározása

A kétdimenziós leképezés (szemben a jobban elterjedt „line scan” eljárással) lehetővé teszi a sejt alapterületének nagy részére kiterjedő megfigyelést és a sparkok egész sejtre vonatkozó gyakoriságának, frekvenciájának megmérését. Mivel a mérések patkány sejteken készültek és a patkányra jellemző az ugynevezett negatív frekvencia-erő összefüggés, a mérések előtt a sejteket minimum két percen keresztül 1 Hz frekvencián téringerteléssel ingereltük, majd közvetlenül a mérés előtt tíz másodpercnyi ingerlésmentes szünetet iktattunk be. Ezzel a protokollal a patkány és egér sejtek SR-ra nyugalmi állapotban jellemző kalcium túltöltődés megszüntethető. A sparkok frekvenciájának időfüggését úgy állapítottuk meg, hogy a kumulatív spark számot az eltelt idő és a (sejt maszk meghatározásával) mért terület szorzatának a függvényében ábrázoltuk (38. ábra). Amennyiben egy lineáris összefüggést láttunk,

a spark frekvencia konstans volt. Ebben az esetben a spark frekvenciát az egyenes meredekségéből kaptuk meg. A 38. ábra A panelén látható esetekben a sparkok frekvenciája rendre 3.65×10^{-5} (körök), 2.48×10^{-5} (háromszögek) és $7.29 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ (keresztek) volt.

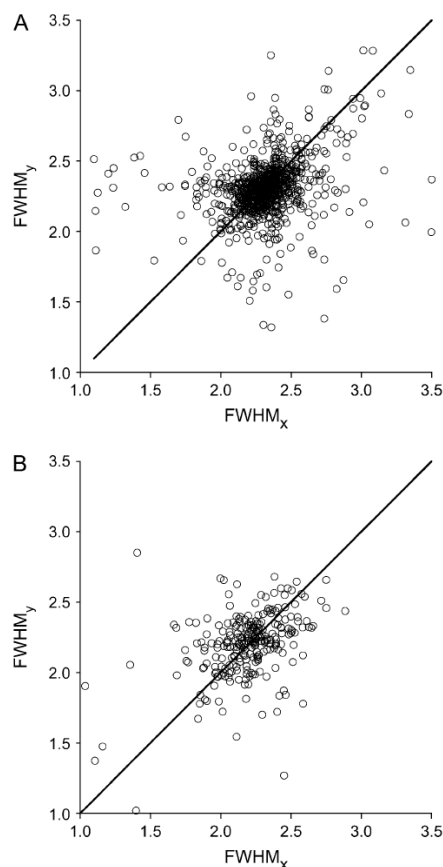
A vizsgálat keretében lemért sejtek 75%-a konstans spark frekvenciával rendelkezett, a további vizsgálatokat ezeken végeztük ($n=6670$). A sejtek 8%-ában a spark frekvencia az idő előrehaladtával növekedett, míg 17%-ban csökkent (38. ábra, B panel). Ezt az összességében 25%-os instabil csoportot a további vizsgálatokból kizártuk. Tapasztalataink szerint az egyes sejtek kummulatív spark számának jelentős individuális szórása volt. A spark frekvencia eloszlásgörbéje erősen aszimmetrikus alakú volt, szélső értékeit 1.7×10^{-6} és $1.3 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ -nak találtuk (38. ábra, C panel). Az átlagra 2.2×10^{-5} , a mediánra $1.2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ értéket kaptunk.

Az általunk talált értékeknek az irodalmi adatokkal történő összevetése kissé problematikus, ugyanis 2D módszerrel végzett spark frekvencia meghatározásra vonatkozó publikált megfigyelést nem találtunk. Az irodalomban található mérések line scan technikával készültek, ami csupán indirekt, közelítő összehasonlításra ad lehetőséget. Ha abból indulunk ki, hogy a confocalis mikroszkóp laterális feloldása $\approx 0.25 \mu\text{m}$, míg az axiális feloldás $\approx 1 \mu\text{m}$ voltak, akkor méréseink során minden $1 \mu\text{m}$ -es sáv leképezésekor a fotonok egy $0.25 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} = 0.25 \mu\text{m}^3$ -os térfogatból származnak. A közös mértékegységre történő konvertáláshoz a saját értékeinket meg kell szorozni $1/\mu\text{m}$ -el, amely az optikai tengely mentén történő mélységből következik. Az irodalomban található *line scan* módszerrel mért spark frekvencia értékek patkány kamrai sejteken $0.85 \text{ spark}/100 \mu\text{m}$ és $4.6 \text{ spark}/100 \mu\text{m}$ között találhatóak [86, 137]. Ezek az adatok átszámítva a 3.4×10^{-5} és $1.8 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ értékeket adják. Saját mérési adataink ugyanezen egységben kifejezve $1.7 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ -nek felelnek meg, ami jó egyezésnek felel meg, de az irodalomban található patkány adatoknál valamivel szélesebb sávot ad. Más fajokon azonban a mi adatainkhoz hasonlóan széles szórást találtak. Hüser és mtsai macska pitvari sejteken figyelte meg, hogy a spark frekvencia $2.4 \times 10^{-6} - 1.8 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ tartományban szóródik [138]. Patkány és macska pitvaron, valamint nyúl kamrai sejteken ezekkel az értékekkel jól egyező spark frekvenciákat mértek más munkacsoportok is [138-140]. Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk megfigyelt spark frekvenciák az első 2D mérésekből származó adatok és az irodalmi értékekkel jó egyezést mutatnak.

39. ábra. A sparkok szimmetrikus alakzatok.

Az egyes sparkok Y-tengely menti szélességének ábrázolása az X-tengely menti szélesség függvényében ($FWHM_Y$ versus $FWHM_X$).

- A. di-8-ANEPPS jelölt sejteken a pontok egy 45°-os szöget bezáró egyenes két oldalán szimmetrikusan elhelyezkedő halmazt alkotnak.
- B. Amennyiben a mérést di-8-ANEPPS-el nem jelölt sejteken végezzük el, a sparkok továbbra is szimmetrikusnak adódnak.

**6.5.2.2. A sparkok alakja szimmetrikus**

A sparkok térbeli kiterjedését kétdimenziós Gauss görbével történő illesztés, majd az amplitúdó félmagasságánál történő szélesség x és y irányú mérésével határoztuk meg ($FWHM$: Full Width at Half Maximum). Az elemzésbe kizárólag azokat a sparkokat vontuk be, amelyek amplitúdója ($\Delta F/F_0$) a 0.2 értéket meghaladta, ezzel biztosítva a zajszintből való megbízható kiemelkedést. Ennek a kritériumnak az általunk összesen detektált 6670 sparkból 907 felelt meg. A kapott szélességekből egyrészt átlagértéket számítottunk, másrészt minden spark esetén grafikusán ábráztuk az Y irányú kiterjedést az X irányú kiterjedés függvényében ($FWHM_Y$ versus $FWHM_X$). A 907 vizsgált spark alapján a kiterjedések átlaga $FWHM_X = 2.32 \pm 0.008 \mu m$ és $FWHM_Y = 2.30 \pm 0.007 \mu m$ voltak ($Mean \pm S.E.$, $p > 0.05$). Amikor a sparkok Y-tengely irányú kiterjedését ábráztuk az X-tengely irányú kiterjedésének függvényében, a pontok egy olyan halmazt alkottak, amelynek szimmetria tengelye 45°-os szöget zárt be a koordináta-rendszer tengelyeivel (39. ábra, A panel). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a sparkok a sejt síkjában szimmetrikus kiterjedésűek.

Mivel a méréseket di-8-ANEPPS-el töltött sejteken végeztük a sparkok térbeli eloszlásának vizsgálata céljából, felmerült annak lehetősége, hogy a szimmetrikus kiterjedés a T-tubulusok és a sparkok egymásra vetülése miatti műtermék. Ennek a lehetőségnek kizárására di-8-ANEPPS festés nélküli sejteken is tanulmányoztunk sparkokat. A vizsgálatba bevont 259 spark esetén az átlagértékek $FWMH_x = 2.22 \pm 0.013 \mu m$ és $FWMH_y = 2.22 \pm 0.013 \mu m$ voltak (Mean \pm S.E, $p > 0.05$). A grafikus elemzés eredménye is megegyezett a di-8-ANEPPS-el töltött sejteken kapottakkal (39. ábra, B panel). Mindezek ismeretében megállapíthatjuk, hogy a sparkok szimmetrikus kiterjedése nem lehet mérési műtermék következménye.

Az a megfigyelésünk, hogy a sparkok kétdimenziós kiterjedése szimmetrikus, ellentétes korábbi ismereteinkkel, melyek szerint a sparkok a T-tubulusokkal párhuzamos irányban (Y-tengely, vagyis a sejt szélessége mentén) keskenyebbek, mint a sejt hossz tengelye irányában [83, 90]. A Parker és *mtsai* által publikált sparkok aszimmetriája igen jelentős, mintegy 2:1 (X:Y) arányú. Bár közleményeikben nem mérték meg az általuk rögzített sparkok kiterjedésének arányait, a jól látható aszimmetriát a Ca^{2+} kötött Fluo-3 diffúziós anizotrópiájával magyarázták [83]. Cheng és *mtsai* ennél lényegesen kisebb mértékű aszimmetriát találtak munkájuk során. Eredményeik azt mutatták, hogy a $FWMH_y$ mintegy 18%-al kisebb mint az $FWMH_x$ [90]. Béka vázizmán nyugalomban ugyancsak szimmetrikus sparkokat figyeltek meg, de ezek a sparkok koffein hatására aszimmetrikussá váltak [89].

Az általunk tapasztalt szimmetria elméletileg származhatott volna a vizsgált sejtjeink véletlenszerű pozícionálásából, amikor a valójában aszimmetrikus sparkok random orientációja kiegyenlítette volna a kiterjedésbeli különbségeket, ezzel eredményezve a látszólagos szimmetriát. Kísérleteinkben azonban éppen azért alkalmaztuk a di-8-ANEPPS festést, hogy a sejtek alakján kívül a T-tubulusok iránya is segítse a vizsgált sejt hossz tengelyének azonosítását és megfelelő beállítását. Emiatt sejtjeink X-Y irányú orientációja igen megbízható volt, vagyis a szimmetria nem lehetett pozícionálási hiba következménye.

A szimmetriaviszonyok téves értékelése származhatott volna képalkotási műtermékből is. A Zeiss 5 Live mikroszkóp esetében egy képvonal leképezése ugyanabban az időpillanatban történik, de két egymást követő vonal között 25 μs különbség van (80Hz-es, 512x512 pixeles leképezést alapul véve). Az időkülönbségből eredő X-Y irányú képtorzítás nagysága függ a leképezett objektum (esetünkben a spark) életidejétől és arányos a kamera záridejének, valamint a spark időbeli lefolyásának viszonyával. Minthogy egy spark átlagos FWMH értéke $\approx 2 \mu m$ és egy pixel mérete $0.12 \mu m$, egy spark leképezésének ideje ≈ 0.4 ms. A sparkok tipikus életideje ≈ 30 ms körül van, vagyis sokkal lassabbak, mint a leképezésükhöz szükséges idő. Tehát a szívben megfigyelhető, viszonylag lassú sparkok esetén a

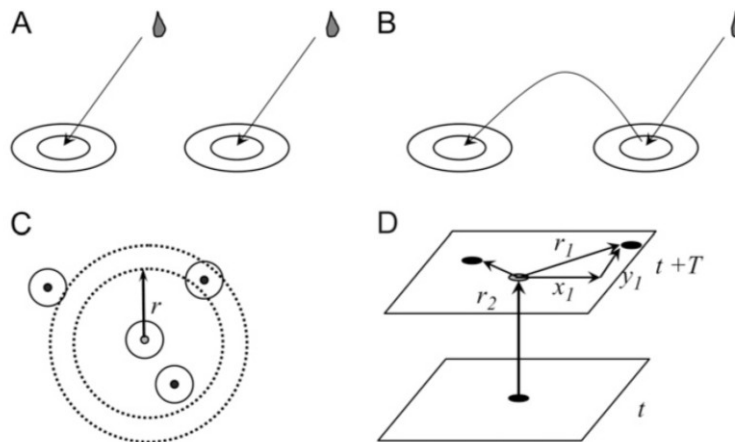
leképezési időből adódó X-Y irányú torzítás jelentéktelennek mondható, ezért feltételezhetjük, hogy a kép jól reprezentálja a valós viszonyokat.

A sparkok szimmetrikus szerkezete jelentős következményekkel jár a Ca^{2+} diffúziós viszonyaival kapcsolatos ismereteinkre. Az általunk megfigyelt diffúziós izotrópia azt sugallja, hogy a Z-vonalak mentén található nagy denzitású fehérje környezet [141] a korábbi feltételezésekkel szemben nincs mérhető hatással a Ca^{2+} diffúziójára. A sparkokat és kalcium hullámokat leíró korábbi matematikai modelljeink arra a feltételezésre épülnek, hogy a Ca^{2+} és Ca^{2+} -kötött Fluo-3 diffúziója anizotróp [87, 142, 143]. Az anizotróp viszonyoknak izotrópra történő cseréje jelentősen megváltoztatja a Ryanodine receptorok Ca^{2+} áramainak számított értékét. Ha például feltételezzük, hogy a diffúziós koefficiens az Y tengely mentén fele az X és Z tengelyének, az egyetlen spark létrehozásához szükséges kalcium áram 56%-a annak a mennyiségnek, amely izotróp diffúzió esetén adódik. Izotróp diffúziós viszonyok esetén ugyanis a gömb alakú spark térfogata az ellipszoid sparkénál nagyobb [143].

6.5.3. A sparkok koordinációja

A sparkok koordinációja alatt az individuális sparkok kialakulásában felismerhető összehangoltságot, az egyes sparkok közötti kapcsolat térbeli és időbeli sajátosságait értjük. Ennek tanulmányozása során azt kívántuk meghatározni, hogy egy adott spark milyen valószínűséggel vált ki egy újabb sparkot adott sugarú környezetében. A jelenség hasonló a pocsolyába hulló esőcseppekhez, amelyek becsapódva hullámgyűrűket váltanak ki a vízfelszínen ez lehet az elsődleges spark analógiája (40. ábra). A becsapódáskor azonban szertefröccsenő vízcseppek is keletkezhetnek, melyek maguk körül újabb, másodlagos hullámgyűrűket indíthatnak.

Az elemzéshez először definiáljuk az elsődleges és másodlagos spark fogalmát. Mindenekelőtt azt szükséges leszögezni, hogy az elsődleges és másodlagos jelzők kizárólag az analízis lebonyolításához szükséges fogalmak, ugyanis egy spark esetében, pusztán a spark tulajdonságainak (amplitúdó, kiterjedés, fennállási idő) vizsgálatával nem lehetséges eldönteni, hogy az spontán jelent meg egy adott helyen és időpillanatban (tehát elsődleges), vagy egy másik spark váltotta ki (vagyis másodlagos). Az elemzés során technikai szempontból minden sparkot elsődlegesnek tekintettünk amikor azonosító algoritmusunk detektálta. Ezt tekintve null időpontnak, további sparkokat kerestünk koordinátáinak $0.3 \mu\text{m} < r < 15 \mu\text{m}$ környezetében 15 ms-on belül. A távolság alsó értékét azért kellett nullánál nagyobbra választani, hogy az azonosító algoritmus a későbbi képkockákon önmagát az elsődleges sparkot ne azonosítsa másodlagos sparkként. A 15 ms nagyon szoros időtartománynak tűnhet, de figyelembe véve, hogy a sparkok átlagos kialakulási ideje 5 ms, lecsengési ideje pedig 10-15 ms körül



40. ábra. Az esőcsepp analógia.

A víz felszínén kétféleképpen alakulhatnak ki hullámgyűrűk: Esőcsepp (A panel), vagy egy esőcsepp által fröccsenő vízcsepp következtében (B panel). Az első esetben a két hullámgyűrű véletlen egybeesés következtében jelenik meg egyidejűleg a víz felszínén. A második esetben a két gyűrű között ok-okozati összefüggés van. A C panel egy központi (elsődleges) hullámgyűrű körüli másodlagos hullámgyűrűket mutat. A pontozott vonalak egy olyan területet jelölnek amelyeket az $r+\Delta r$ távolságok határolnak. A D panel mutatja a sparkok távolságának számítási módját. Az egyes síkok egy-egy konfokális képnek felelnek meg. Az elsődleges spark a t képkockán jelenik meg, a másodlagos sparkok a $t+T$ képkockán. A sparkok koordinátáinak felhasználásával az r_1 és r_2 távolságok a geometriai szabályok segítségével meghatározhatóak.

van, ez az érték elgendően tág egy megbízható azonosításhoz, ugyanakkor nem okozza a másodlagos sparkok számának jelentős alulbecslését. Amint egy adott spark esetében a potenciális másodlagos sparkok azonosítása befejeződött, a spark kereső program a következő képkockára lépett és minden azon felbukkanó sparkot elsődleges sparkként kezelt (tehát az előző ciklusban másodlagosként azonosítottat is), majd ezzel indította a másodlagos sparkok keresését. Erre azért volt szükség, mert a másodlagos sparkok ugyanúgy kiválthattak újabb sparkokat a környezetükben mint az, amelyik őket létrehozta. Ismert a 4-8 tagból álló „ugráló” sparkok (jumping sparks) fogalma, amikor a láncszerűen terjedő sparkok sorban aktiválják az időben utánuk következőket [144].

6.5.3.1. Módszertani megközelítés: a sparkok kialakulásának sűrűségfüggvénye

A probléma vizsgálatához szükségünk lesz a sparkok kialakulásának valószínűségét az elsődleges sparktól mért távolság függvényében leíró $f(r)$ sűrűségfüggvényre. Az ilyen problémák esetében a legkézenfekvőbb megoldás a hagyományos hisztogramm készítés (pl 1 μm -es lépésközzel). A hisztogramoknak azonban hátrányos tulajdonsága, hogy érzékenyek az általában önkényesen

megválasztott osztályok szélességére, illetve határainak konkrét értékére. Ez a probléma megkerülhető, ha az úgynevezett *kernel módszer* alkalmazásával előállított folytonos sűrűségfüggvényen végezzük el az elemzést. A matematikában jól ismert és széles körben alkalmazott *kernel módszerek* lényege, hogy a nemlineáris függvényt, vagy adathalmazt nemlineáris transzformációk segítségével több dimenziós térbe transzformálják, ahol az már lineárisan megoldható. A *kernel módszerrel* generált sűrűségfüggvény folytonos jellege miatt nem érzékeny az osztályok hatáira, vagy szélességére [145].

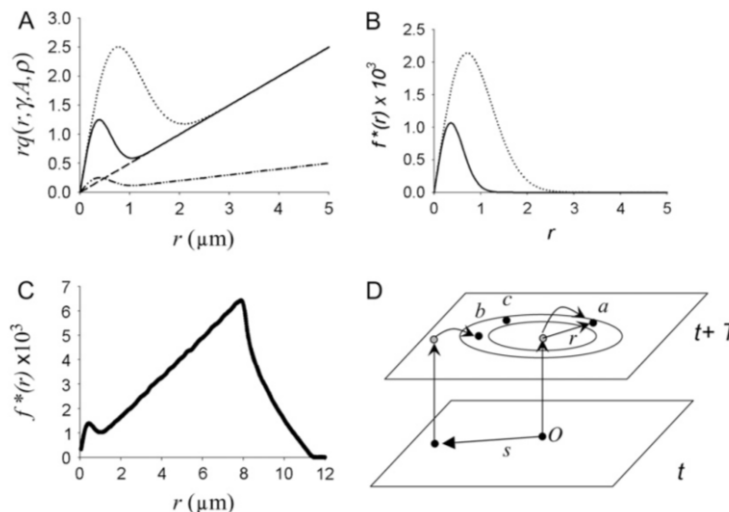
A sűrűségfüggvényt az alábbiak szerint írjuk fel:

$$\phi(r, \gamma, A, \rho) = \gamma \left(1 + A \exp \left(-\frac{r^2}{\rho^2} \right) \right)$$

Ahol γ a sparkok intrinsic frekvenciája, A a sparkok közötti kapcsolat erősségét adja meg, r az elsődleges sparktól mért távolság, ρ pedig az A paraméter térkonstansa.

6.5.3.2. A sparkok közötti kapcsolat erőssége és annak távolságfüggése

A sparkok $f^*(r)$ tapasztalati gyakoriságát ezzel a függvénnyel illesztve jól látható, hogy az elsődleges sparkok mintegy 2 μm -es környezetében az újabb spark kialakulásának valószínűsége kiemelkedően magas (42. ábra). A sűrűséggörbén az $r \approx 0$ távolságban egy magas csúcs látható. Ez a csúcs mutatja azon sparkokat, amelyek az elsődleges spark közvetlen környezetében alakultak ki. A csúcs magasságát és szélességét a sparkok kapcsolatának erőssége (A) és a térkonstans (ρ) határozzák meg. Ha $A=0$, akkor a sparkok között nincs kapcsolat és az $r=0$ pont környezetében nem jelenik meg csúcs. Ilyen helyzet látható az 41. ábra A paneljén szaggatott vonallal jelölve. Ekkor az elsődleges spark környezetében a sparkok várható gyakorisága megegyezik a nagy távolságban mért gyakorisággal. Az A paraméter értéke a kísérleti adatok alapján 45.9, ami a sparkok közötti erős kapcsolatra utal. A térkonstans (ρ) értéke 0.97 μm -nek adódott, ami azt jelenti, hogy a sparkok csak igen szűk környezetükben válhatnak ki újabb sparkokat, hatásuk 2 μm -nél távolabb már elhanyagolható. A 42 ábra B paneljén pontokkal jelöljük a CRU-k térbeli elrendeződését két különböző helyzetre. A bal oldali panelen a z-vonalak közötti távolság 2 μm , a CRU-k távolsága pedig 1 μm . Kör jelöli a 2 μm sugarú környezetet, amin belül egy spark képes újabb sparkot kiváltani. Látható, hogy ebben az elrendeződésben a sparkok terjedése a z-vonal mentén nagyobb valószínűséggel következik be, mint a z-vonalak között. Ha a CRU-kat a z-vonalakon még sűrűbben helyezzük el, ez tovább növeli a transzverzális irányú terjedés lehetőségét azáltal, hogy az elsődleges spark környezetében megduplázza az aktiválható CRU-k számát. A sparkok intrinsic gyakoriságát (γ) az illesztés alapján $8.14 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^2/\text{ms}$ -nek határoztuk meg.



41. ábra. A szomszédos sparkok száma az elsődleges sparktól mért távolság függvényében. Matematikai modellel számított adatok.

A. az $r_q(r; \gamma, A, \rho)$ függvény értékei különböző paraméterkombináció esetén. Szaggatott vonal: $\gamma=5 \times 10^{-4}$, $A=0$, $\rho=0.5$; folyamatos vonal: $\gamma=5 \times 10^{-4}$, $A=10$, $\rho=0.5$; pontozott vonal: $\gamma=5 \times 10^{-4}$, $A=10$, $\rho=1$; pontozott-szaggatott vonal: $\gamma=1 \times 10^{-4}$, $A=10$, $\rho=0.5$.

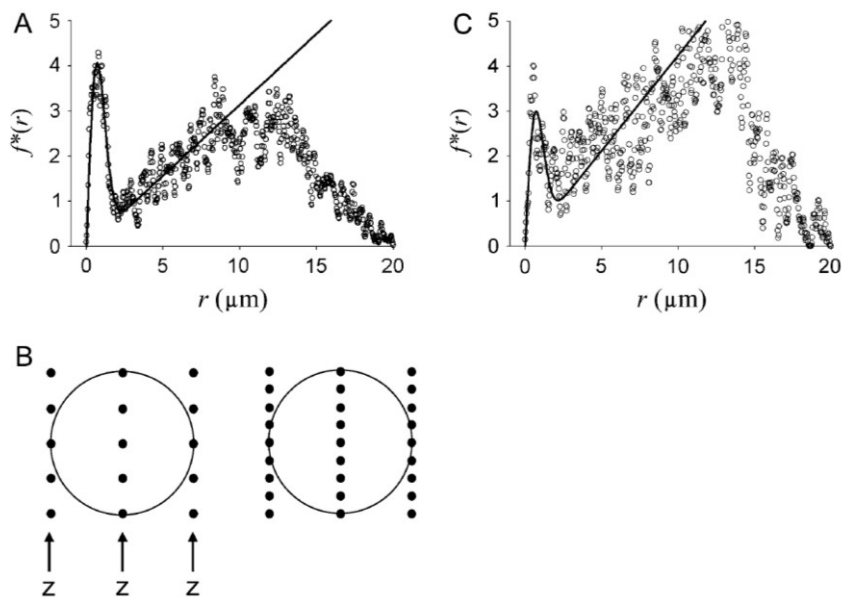
B. az $r_q(r; \gamma, A, \rho) - r_q(r; \gamma, 0, \rho)$ különbsége. Az egyes görbék az A panelen azonos stílusú vonallal jelölt görbéknek felelnek meg.

C. valós sejt méret figyelembevételével a matematikai modellből számított kummulatív spark számok $\{f^*(r)\}$ az elsődleges sparktól mért távolság $\{r\}$ függvényében.

D. két képkocka (t , $t+T$) amelyen egy elsődleges spark (O) látható. Az a sparkot az O spark váltotta ki, b spark egy, az elsődleges sparktól s távolságban lévő spark által kiváltott spark, a c spark független esemény eredménye.

6.5.3.3. A sparkok modellezése

A megfigyelt adatok ellenőrzése céljából modell vizsgálatot végeztünk. Ebben a sparkokat egy $40 \times 40 \mu\text{m}$ kiterjedésű kétdimenziós síkban modelleztük. A CRU távolságot a valós érték tizedére csökkentettük ($0.2 \times 0.1 \mu\text{m}$) annak érdekében, hogy a valós spark frekvenciánál nagyobb értéket kapjunk, ami felgyorsítja a modell futását. Minden CRU-hoz azonos spontán spark generálási valószínűséget rendeltünk. Ha egy CRU sparkot generált, akkor az r környezetében lévő CRU-k tüzelési valószínűségét a kísérleteinkben meghatározott φ értékre növeltük. A modell vizsgálatok alapján számított intrinsic gyakoriság (γ) $5 \times 10^{-4} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$ -nek adódott, ami jelentős eltérés a kísérletekben meghatározott értéktől. Az eltérés lehetséges oka, hogy az elsődleges spark környezetében megjelenő spark nem feltétlenül áll ok-okozati viszonyban az őt időben megelőző sparkkal. Ahogy a 41. ábra D paneljén látható, az r sugarú környezetben megjelenhet olyan spark (b) is, amelyet egy távolabb lévő spark indukál. Ezek a sparkok a sparkok közötti kapcsolatot jellemző (A) paraméter túlbecslését eredményezik.



42. ábra. A sparkok gyakorisága az elsődleges sparktól mért távolság függvényében.

A: A sparkok gyakorisága az elsődleges spark 2 μm -es környezetében lényegesen magasabb mint ami az intrinsic frekvenciából következne (5 μm -es távolságon kívüli lineáris szakasz).

B: A CRU-k elhelyezkedését szemléltető vázlat a 2 μm -es sugarú körön belül, ahol az A panelen látható sűrűségfüggvény szerint erős kapcsolat áll fenn a sparkok között. A bal oldali panel azt a situációt mutatja amikor a CRU-k távolsága a z-vonal síkjában 1 μm . A jobb panelen a távolság 0.5 μm .

C: Alacsony Na^+ tartalmú Tyrode oldatban az SR Ca^{2+} töltődése miatt megnövekszik a sparkok gyakorisága. Ez a növekedés azonban csak az intrinsic gyakoriságot érinti, a sparkok közötti kapcsolat erőssége nem változik.

Ha azonban az A értékét az első elemzésben kapott 45.9-ről 29.75-re csökkentjük, a modellből számított γ értéke $7.7 \times 10^{-4} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$ lett, jól reprodukálva a kísérleti adatokból számoltat.

6.5.3.4. A sparkok vizsgálata alacsony Na^+ tartalmú oldatban

Analitikai eljárásunkat szeretnénk volna olyan viszonyok között tesztelni, amikor a sparkok intrinsic gyakorisága (esetleg egyéb paraméterei) eltérnek a nyugalmi állapotban mértektől. A sejtek egy csoportját ezért olyan Tyrode oldatban vizsgáltuk, melynek Na^+ tartalmát 145-ről 115 mM-ra csökkentettük, ozmotikusan azonos mennyiségű n-metil-d-glucamin-nal pótolva a hiányzó részt. Ilyen környezetben a szívizomsejtek SR-je Ca^{2+} -al túltöltődik (Ca^{2+} overload), amely ismert módon megnöveli a sparkok gyakoriságát. Ahogy várható volt, ilyen viszonyok között a sparkok gyakorisága megnőtt ($\gamma = 4.24 \times 10^{-5} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$), érdekes módon azonban a kapcsolat erőssége lecsökkent ($A = 15,31$), míg a térkonstans változatlan maradt ($\rho = 0,97 \mu\text{m}$). A sparkok gyakoriságát és amplitúdóját alapvetően meghatározza a CRU-k (Ca^{2+})_i iránti érzékenysége. A (Ca^{2+})_i magasabb alapértéke mellett az elsődleges spark környezetében több CRU aktiválódhat, ami megmagyarázza a megemelkedett intrinsic

gyakoriságot. Az SR megemelkedett Ca^{2+} tartalma ugyancsak a frekvencia növekedésének irányában hat [ED 29, 30]. A kapcsolat erősségének csökkenését a sparkok amplitúdójának változása magyarázhatja. Feltételezhetően az átlagos spark amplitúdó Tyrode oldatban nagyobb, mint alacsony Na^+ tartalmú közegben, ugyanis a megemelkedett $(\text{Ca}^{2+})_i$ magasabb bazális fluorescencia értéket okoz, ami a sparkok mért amplitúdójának csökkenését eredményezheti. Az adatok elemzése megmutatta, hogy normál Tyrode oldatban a sparkok amplitúdója csakugyan magasabb mint alacsony Na^+ tartalmú közegben (0.136 vs. 0.117, $p < 10^{-4}$), ami valószínűsíti, hogy ezekben a kísérletekben a sparkok számát alulmértük és ez vezethetett az A paraméter alulbecslésére.

7. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

A munka során elért új tudományos eredmények, megállapítások és következtetések

1. Izolált emlős kamrai szívizomsejteken meghatároztuk az elsődleges kultúrában tartás alatt kifejlődő szerkezeti és funkcionális változásokat. Megállapítottuk, hogy a kultúrában tartott sejtek elektrofiziológiai célokra 48 órán át megbízhatóan felhasználhatóak.
2. Kifejlesztettük a Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technikát, mely lehetővé teszi több ionáram egyazon sejtben történő akciós potenciál alatti mérését.
3. Új, automatizált módszert dolgoztunk ki a sparkok detektálására és elemzésére.
4. Akciós potenciál clamp technika segítségével feltérképeztük az emlős kamrai szívizomsejtek kardinális ionáramainak ($I_{Ca,L}$, I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) akciós potenciál alatti lefutását.
5. Tanulmányoztuk az $I_{Ca,L}$ transmuralis heterogenitását. Megállapítottuk, hogy endocardialis sejtekben az áram a korai csúcsot követően gyorsan inaktíválódik, epicardialis sejtekben pedig az első csúcsot követi egy második csúcs az incisura alatt.
6. Megállapítottuk, hogy az akciós potenciál incisura alatti repolarizációja képes deaktiválni az L-típusú kalcium csatornát és a deaktiválódott csatornák reaktivációja hozza létre az epicardialis sejtekre jellemző dómot.
7. Megmutattuk, hogy az akciós potenciál alatt az L-típusú kalcium csatornák képesek többszöri záródásra és megnyílásra, amely jelenség hozzájárul az akciós potenciál formájának kialakításához és elősegítheti a korai típusú utódepolarizációk (EAD) létrejöttét.
8. Először mutattuk meg kísérletesen, hogy a kamrai szívizomsejtek klorid árama az akciós potenciál alatt két fázisú. A korai fázis a repolarizációhoz, a késői fázis a depolarizációhoz járul hozzá.
9. Tanulmányoztuk a klorid áram szerepét a ritmuszavarok kialakulásában. Megfigyeltük, hogy a klorid áram gátlása fokozza az utódepolarizációs aritmiák kialakulásának esélyét.
10. Megfigyeltük, hogy a bikarbonát ion csökkenti kutya kamrai izomsejtekben az utódepolarizációs aritmiák kialakulásának gyakoriságát.
11. Megfigyeltük, hogy kutya kamrai szívizom sejtjeiben a befelé egyenirányító kálium áram és a késői egyenirányító kálium áram gyors komponense időben szinkronizált módon működik és csúcsaik egybe esnek az akciós potenciál terminális repolarizációjának legyorsabb szakaszával. Az időbeli

szinkronitás ellenére a repolarizáció meredeksége és az áramok amplitúdója között csak az I_{K1} esetében találtunk korrelációt.

12. Megállapítottuk továbbá, hogy a befelé egyenirányító kálium áram csúcsa és a késői egyenirányító kálium áram gyors komponensének farokárama frekvenciafüggetlen szabályozás alatt áll.
13. Tanulmányoztuk a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének szerepét a repolarizációban. Megmutattuk, hogy az áram az akciós potenciál alakjának megformálásában jelentős szerepet tölt be. Feltártuk azt a koordinációs mechanizmus, melynek révén az áram aktivációját az akciós potenciál plató magassága szabályozza.
14. Megállapítottuk, hogy szívben a legtöbb ioncsatornára ható szer akciós potenciál hosszára gyakorolt hatásának erőssége az ingerlési frekvenciától függ.
15. Új hipotézist dolgoztunk ki a frekvencia függő hatások magyarázatául. Kísérleti adataink arra utalnak, hogy a jelenségért az akciós potenciál nyugalmi hosszának frekvenciafüggése a felelős. A hipotézist több fajon teszteltük és megerősítettük.
16. Megfigyeltük, hogy az emlős kamrai akciós potenciál alatti ionáramok varianciája egy egész nagyságrendet ér el. Kimutattuk, hogy ugyanakkor az ionáramok intenzitása és az akciós potenciálok paraméterei között nincs kapcsolat.
17. Először határoztuk meg és írtuk le a Na^+/Ca^{2+} csereáram akciós potenciál alatti lefutását kísérletes módszerrel. Megmutattuk, hogy az áram inward csúcsa az utódepolarizációk feszültségtartományában jelentkezik, késői komponense pedig az akciós potenciál végén jellegzetes utópotenciált hoz létre.
18. Megállapítottuk, hogy a patkány kamrai szívműködésében megfigyelhető sparkok alakja szimmetrikus.
19. 2D eljárással először mértük meg patkány kamrai szívműködésében a megjelenő sparkok frekvenciáját. Megállapítottuk, hogy az nagyságrendileg jó egyezést mutat a line scan metodikával kapott eredményekkel, de a sejtek között megfigyelhető individuális szórás az irodalmi értékeknél magasabbnak találtuk.
20. Megállapítottuk, hogy patkány kamrai izomsejtekben a sparkok közötti kapcsolat erőssége és térkonstansa $A=29.75$ és $\rho=0.97 \mu m$. Megmutattuk, hogy SR Ca^{2+} -al történő túltöltését követően (Ca^{2+} overload) a kapcsolat erőssége csökken ($A=15.31$), míg a térkonstans értéke változatlan marad.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatómunkámat - a tanulmányutak időtartamának kivételével - a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Élettani Intézetében végeztem. Hálával gondolok Dr. Kovács Tibor professzorra és Dr. Szabó Imrére, akik első mentoraim, témavezetőim voltak. Dr. Kovács Tibor professzor később mint első munkacsoportvezetőm segítette pályára állásomat, szakmai tudásával és kapcsolataival támogatva első lépéseimet. Köszönettel tartozom Intézetem igazgatóinak, Dr. Varga Emil professzornak, Kovács László akadémikusnak és Dr. Csernoch László professzornak, akik vezetése alatt létrejött és gyarapodott az a tudományos műhely, amelyben munkámat végezhettem.

Itthoni tudományos tevékenységemet Intézetünk Szív Elektrofiziológiai Munkacsoportjában végeztem. Köszönettel tartozom munkacsoportvezetőmnek, Dr. Nánási Péter professzornak és kollégáimnak, Magyar János professzornak, Dr. Szentandrassy Norbertnek és Dr. Horváth Baláznak. A munkában pótolhatatlan segítséget nyújtottak egykori és jelenlegi PhD. hallgatóink Dr. Bárándi László, Dr. Birinyi Péter, Dr. Fülöp László, Dr. Hegyi Bence, Dr. Ruzsnavszky Ferenc, Dr. Szabó Gergely, Dr. Szigligeti Péter. A mindennapi munkában, a technikai feladatok megoldásában fáradhatatlanul támogatott és segédkezett Fánkuly László, Vigné Horváth Katalin, Láber Katalin és Oláh István.

Köszönöm mindazon kollégáimnak a kapott segítséget, akikkel kollaborációs munkák, illetve publikációs tevékenységem során együtt dolgozhattam.

Külön szeretnék megemlékezni azokról a kollégákról, akik külföldi intézeteiben hosszabb-rövidebb tanulmányúton vettem részt, majd később kollaborációs partnereim voltak. Hálás szívvel gondolok Robert D. Fugate, Ye Chen-Izu, Leighton T. Izu, Szabó Béla és Antonio Zaza professzorokra.

Külön szeretném kifejezni köszönetemet a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 projekt támogatásért, amit a disszertáció elkészítéséhez nyújtott.

Hálával tartozom családomnak támogatásukért és türelmükért.

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM. A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Jan; 48(1): 112-21.
- [2] Iyer V, Mazhari R, Winslow RL. A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophysical journal*. 2004 Sep; 87(3): 1507-25.
- [3] Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circulation research*. 1994 Jun; 74(6): 1071-96.
- [4] Luo CH, Rudy Y. A DYNAMIC-MODEL OF THE CARDIAC VENTRICULAR ACTION-POTENTIAL .1. SIMULATIONS OF IONIC CURRENTS AND CONCENTRATION CHANGES. *Circulation research*. 1994 Jun; 74(6): 1071-96.
- [5] Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. *Biophysical journal*. 2004 Nov; 87(5): 3351-71.
- [6] Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Lzu LT, Chen-Izu Y. Sequential dissection of multiple ionic currents in single cardiac myocytes under action potential-clamp. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011 Mar; 50(3): 578-81.
- [7] Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Ye C-I. Profile of L-type Ca^{2+} current and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2012 Jan; 9(1): 134-42.
- [8] Banyasz T, Magyar J, Szentandrassy N, Horvath B, Birinyi P, Szentmiklosi J, et al. Action potential clamp fingerprints of K^{+} currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiologica*. 2007 Jul; 190(3): 189-98.
- [9] Banyasz T, Fulop L, Magyar J, Szentandrassy N, Varro A, Nanasi PP. Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovascular research*. 2003 Apr; 58(1): 66-75.
- [10] Doerr T, Denger R, Doerr A, Trautwein W. IONIC CURRENTS CONTRIBUTING TO THE ACTION-POTENTIAL IN SINGLE VENTRICULAR MYOCYTES OF THE GUINEA-PIG STUDIED WITH ACTION-POTENTIAL CLAMP. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 1990 May; 416(3): 230-7.
- [11] Doerr T, Denger R, Trautwein W. CALCIUM CURRENTS IN SINGLE SA NODAL CELLS OF THE RABBIT HEART STUDIED WITH ACTION-POTENTIAL CLAMP. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 1989 Apr; 413(6): 599-603.
- [12] Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 2000 Mar; 439(5): 588-99.

- [13] Linz KW, Meyer R. Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1998 Dec 1; 513(2): 425-42.
- [14] Grantham CJ, Cannell MB. Ca²⁺ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*. 1996 Aug; 79(2): 194-200.
- [15] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. IMPROVED PATCH-CLAMP TECHNIQUES FOR HIGH-RESOLUTION CURRENT RECORDING FROM CELLS AND CELL-FREE MEMBRANE PATCHES. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 1981 1981; 391(2): 85-100.
- [16] Chen-Izu Y, Izu LT, Nanasi PP, Banyasz T. From Action Potential-Clamp to "Onion-Peeling" Technique – Recording of Ionic Currents Under Physiological Conditions. In: Kanez FS, editor. *Patch Clamp Technique*. Rijeka: InTech; 2012, p. 143-62.
- [17] Bolck B, Munch G, Mackenstein P, Hellmich M, Hirsch I, Reuter H, et al. Na⁺/Ca²⁺ exchanger overexpression impairs frequency- and ouabain-dependent cell shortening in adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004 Oct; 287(4): H1435-H45.
- [18] Arruda LH, Cestari IA, Leirner AA, Cestari IN. Adenoviral expression of calmodulin antisense reduces hypertrophy in cultured cardiomyocytes. *Artificial Organs*. 2007 Apr; 31(4): 274-7.
- [19] Berger HJ, Prasad SK, Springhorn JP, Ellingsen O, Kelly RA, Smith TW. CONTINUOUS HOMOGENEOUS FIELD STIMULATION OF ADULT-RAT VENTRICULAR MYOCYTES PRESERVES CONTRACTILE FUNCTION AND LIMITS PHENOTYPIC ADAPTATION IN PRIMARY CULTURE. *Circulation*. 1992 Oct; 86(4): 177-.
- [20] Ellingsen O, Davidoff AJ, Prasad SK, Berger HJ, Springhorn JP, Marsh JD, et al. ADULT-RAT VENTRICULAR MYOCYTES CULTURED IN DEFINED MEDIUM - PHENOTYPE AND ELECTROMECHANICAL FUNCTION. *American Journal of Physiology*. 1993 Aug; 265(2): H747-H54.
- [21] Horackova M, Croll RP, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA. Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons. *Tissue & Cell*. 1996 Aug; 28(4): 411-25.
- [22] Horackova M, Byczko Z. Differences in the structural characteristics of adult guinea pig and rat cardiomyocytes during their adaptation and maintenance in long-term cultures: Confocal microscopy study. *Experimental Cell Research*. 1997 Nov 25; 237(1): 158-75.
- [23] Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular research*. 1998 Aug; 39(2): 280-300.
- [24] Poindexter BJ, Smith JR, Buja LM, Bick RJ. Calcium signaling mechanisms in dedifferentiated cardiac myocytes: comparison with neonatal and adult cardiomyocytes. *Cell calcium*. 2001 Dec; 30(6): 373-82.
- [25] Schiess MC, Poindexter BJ, Brown BS, Bick RJ. The effects of CGRP on calcium transients of dedifferentiating cultured adult rat cardiomyocytes compared to non-cultured adult cardiomyocytes: possible protective and deleterious results in cardiac function. *Peptides*. 2005 Mar; 26(3): 525-30.
- [26] Horackova M, Byzsko Z, MailletFrotten L. Immunohistochemical analysis of the adaptation of adult guinea-pig cardiomyocytes in long-term cultures and in cocultures with cardiac neurons: A novel model for studies of myocardial function. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997 Jul; 172(1-2): 227-38.
- [27] Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, Pimental D, Ellingsen O, Marsh JD, et al. CONTINUAL ELECTRIC-FIELD STIMULATION PRESERVES CONTRACTILE FUNCTION OF ADULT VENTRICULAR MYOCYTES IN PRIMARY CULTURE. *American Journal of Physiology*. 1994 Jan; 266(1): H341-H9.
- [28] Akuzawa-Tateyama M, Tateyama M, Ochi R. Sustained beta-adrenergic stimulation increased L-type Ca²⁺ channel expression in cultured quiescent ventricular myocytes. *Journal of Physiological Sciences*. 2006 Apr; 56(2): 165-72.

- [29] Davidoff AJ, Maki TM, Ellingsen O, Marsh JD. Expression of calcium channels in adult cardiac myocytes is regulated by calcium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1997 Jul; 29(7): 1791-803.
- [30] Polonchuk L, Elbel J, Eckert L, Blum J, Wintermantel E, Eppenberger HM. Titanium dioxide ceramics control the differentiated phenotype of cardiac muscle cells in culture. *Biomaterials*. 2000 Mar; 21(6): 539-50.
- [31] Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C. IONIC BASES FOR ELECTROPHYSIOLOGICAL DISTINCTIONS AMONG EPICARDIAL, MID-MYOCARDIAL, AND ENDOCARDIAL MYOCYTES FROM THE FREE WALL OF THE CANINE LEFT-VENTRICLE. *Circulation research*. 1993 Mar; 72(3): 671-87.
- [32] Furukawa T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. POTASSIUM RECTIFIER CURRENTS DIFFER IN MYOCYTES OF ENDOCARDIAL AND EPICARDIAL ORIGIN. *Circulation research*. 1992 Jan; 70(1): 91-103.
- [33] Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, et al. Distinct transient outward potassium current (I-to) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*. 1999 Apr; 113(4): 581-600.
- [34] Bryant SM, Wan XP, Shipsey SJ, Hart G. Regional differences in the delayed rectifier current (I-Kr and I-Ks) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovascular research*. 1998 Nov; 40(2): 322-31.
- [35] Drouin E, Charpentier F, Gauthier C, Laurent K, Lemarec H. ELECTROPHYSIOLOGIC CHARACTERISTICS OF CELLS SPANNING THE LEFT-VENTRICULAR WALL OF HUMAN HEART - EVIDENCE FOR PRESENCE OF M-CELLS. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995 Jul; 26(1): 185-92.
- [36] Fedida D, Giles WR. REGIONAL VARIATIONS IN ACTION-POTENTIALS AND TRANSIENT OUTWARD CURRENT IN MYOCYTES ISOLATED FROM RABBIT LEFT-VENTRICLE. *Journal of Physiology-London*. 1991 Oct; 442: 191-209.
- [37] Sicouri S, Antzelevitch C. ELECTROPHYSIOLOGIC CHARACTERISTICS OF M-CELLS IN THE CANINE LEFT-VENTRICULAR FREE-WALL. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1995 Aug; 6(8): 591-603.
- [38] Yan GX, Shimizu W, Antzelevitch C. Characteristics and distribution of M cells in arterially perfused canine left ventricular wedge preparations. *Circulation*. 1998 Nov 3; 98(18): 1921-7.
- [39] Stankovicova T, Szilard M, De Scheerder I, Sipido KR. M cells and transmural heterogeneity of action potential configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart. *Cardiovascular research*. 2000 Mar; 45(4): 952-60.
- [40] Akar FG, Yan GX, Antzelevitch C, Rosenbaum DS. Unique topographical distribution of m cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation*. 2002 Mar 12; 105(10): 1247-53.
- [41] Roberts-Thomson KC, Lau DH, Sanders P. The diagnosis and management of ventricular arrhythmias. *Nature Reviews Cardiology*. 2011 Jun; 8(6): 311-21.
- [42] Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, Chen P-S, Qu Z. Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010 Dec; 7(12): 1891-9.
- [43] Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: Linking Heart Failure and Arrhythmias. *Circulation research*. 2012 Jun; 110(12): 1661-77.
- [44] Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic ventricular arrhythmias: Experimental models and their clinical relevance. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. Dec; 8(12): 1963-8.
- [45] McCauley MD, Wang T, Mike E, Herrera J, Beavers DL, Huang TW, et al. Pathogenesis of lethal cardiac arrhythmias in Mecp2 mutant mice: implication for therapy in Rett syndrome. *Science translational medicine*. 2011 Dec 14; 3(113): 113ra25.
- [46] Hancox JC, Daggrell SA. Perspective: does ranolazine have potential for the treatment of atrial fibrillation? *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Dec; 19(12): 1465-74.

- [47] Maier LS. A novel mechanism for the treatment of angina, arrhythmias, and diastolic dysfunction: inhibition of late I(Na) using ranolazine. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009 Oct; 54(4): 279-86.
- [48] Jacobshagen C, Belardinelli L, Hasenfuss G, Maier LS. Ranolazine for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction: background, aims, and design of the RALI-DHF study. *Clinical cardiology*. 2011 Jul; 34(7): 426-32.
- [49] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10; 415(6868): 198-205.
- [50] Casini S, Verkerk AO, van Borren MM, van Ginneken AC, Veldkamp MW, de Bakker JM, et al. Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 2009 Jan 1; 81(1): 72-81.
- [51] Bers DM, Grandi E. Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II Regulation of Cardiac Ion Channels. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009 Sep; 54(3): 180-7.
- [52] Antoons G, Sipido KR. Targeting calcium handling in arrhythmias. *Europace*. 2008 Dec; 10(12): 1364-9.
- [53] Guo D, Zhao X, Wu Y, Liu T, Kowey PR, Yan G-X. L-type calcium current reactivation contributes to arrhythmogenesis associated with action potential triangulation. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2007 Feb; 18(2): 196-203.
- [54] Xie L-H, Weiss JN. Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009 Sep; 297(3): H997-H1002.
- [55] Antoons G, Thomsen MB. Repolarization variability and early afterdepolarizations in long QT syndrome type 2: Is labile calcium the common denominator? *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010 Nov; 7(11): 1695-6.
- [56] Zeng J, Rudy Y. Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophysical journal*. 1995 Mar; 68(3): 949-64.
- [57] Priori SG, Corr PB. Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *The American journal of physiology*. 1990 Jun; 258(6 Pt 2): H1796-805.
- [58] Guo D, Young L, Wu Y, Belardinelli L, Kowey PR, Yan G-X. Increased late sodium current in left atrial myocytes of rabbits with left ventricular hypertrophy: its role in the genesis of atrial arrhythmias. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2010 May; 298(5): H1375-H81.
- [59] Maltsev VA, Undrovinas A. Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Progress in biophysics and molecular biology*. 2008 Jan-Apr; 96(1-3): 421-51.
- [60] Moreno JD, Clancy CE. Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012 Mar; 52(3): 608-19.
- [61] Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current". *Pharmacology & Therapeutics*. 2008 Sep; 119(3): 326-39.
- [62] Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *Journal of Physiology-London*. 2009 May 15; 587(10): 2163-77.
- [63] Yamamoto S, Ehara T. Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006 May; 290(5): H1905-H14.
- [64] Hiraoka M, Kawano S, Hirano Y, Furukawa T. Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovascular research*. 1998 Oct; 40(1): 23-33.
- [65] Sziget G, Rusznak Z, Kovacs L, Papp Z. Calcium-activated transient membrane currents are carried mainly by chloride ions in isolated atrial, ventricular and Purkinje cells of rabbit heart. *Experimental Physiology*. 1998 Mar; 83(2): 137-53.
- [66] Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 1998 May; 38(2): 441-50.

- [67] Lu ZB, Kamiya K, Opthof T, Yasui K, Kodama I. Density and kinetics of I-Kr and I-Ks in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I-Ks blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit - Implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation*. 2001 Aug; 104(8): 951-6.
- [68] Nakashima H, Gerlach U, Schmidt D, Nattel S. In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovascular research*. 2004 Mar; 61(4): 705-14.
- [69] Lengyel C, Jost N, Virag L, Varro A, Lathrop DA, Papp JG. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I-Ks) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT(c) and action potential duration. *British journal of pharmacology*. 2001 Jan; 132(1): 101-10.
- [70] Li GR, Feng JL, Yue LX, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circulation research*. 1996 Apr; 78(4): 689-96.
- [71] Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, et al. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002 Jul; 283(1): H126-H38.
- [72] Varro A, Balati B, Jost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, et al. The role of the delayed rectifier component I-Ks in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *Journal of Physiology-London*. 2000 Feb; 523(1): 67-81.
- [73] Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spatjens R, Beekman JDM, et al. Probing the contribution of I-Ks to canine ventricular repolarization - Key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation*. 2003 Jun; 107(21): 2753-60.
- [74] Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P, et al. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation - A vital role for I-Ks in human ventricular muscle. *Circulation*. 2005 Sep 6; 112(10): 1392-9.
- [75] Stern MD. THEORY OF EXCITATION-CONTRACTION COUPLING IN CARDIAC-MUSCLE. *Biophysical journal*. 1992 Aug; 63(2): 497-517.
- [76] Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. CALCIUM SPARKS - ELEMENTARY EVENTS UNDERLYING EXCITATION-CONTRACTION COUPLING IN HEART-MUSCLE. *Science*. 1993 Oct 29; 262(5134): 740-4.
- [77] Lopezlopez JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG. LOCAL, STOCHASTIC RELEASE OF CA²⁺ IN VOLTAGE-CLAMPED RAT-HEART CELLS - VISUALIZATION WITH CONFOCAL MICROSCOPY. *Journal of Physiology-London*. 1994 Oct 1; 480: 21-9.
- [78] Lopezlopez JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG. LOCAL CALCIUM TRANSIENTS TRIGGERED BY SINGLE L-TYPE CALCIUM-CHANNEL CURRENTS IN CARDIAC-CELLS. *Science*. 1995 May 19; 268(5213): 1042-5.
- [79] Tsugorka A, Rios E, Blatter LA. IMAGING ELEMENTARY EVENTS OF CALCIUM-RELEASE IN SKELETAL-MUSCLE CELLS. *Science*. 1995 Sep 22; 269(5231): 1723-6.
- [80] Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical journal*. 1999 Sep; 77(3): 1528-39.
- [81] Chen-Izu Y, McCulle SL, Ward CW, Soeller C, Allen BM, Rabang C, et al. Three-dimensional distribution of ryanodine receptor clusters in cardiac myocytes. *Biophysical journal*. 2006 Jul; 91(1): 1-13.
- [82] Soeller C, Gilbert R, Cannell MB. The distribution of ryanodine receptor clusters and its relationship to the contractile apparatus in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*. 2007 Jan; 258A-A.
- [83] Parker I, Zang WJ, Wier WG. Ca²⁺ sparks involving multiple Ca²⁺ release sites along Z-lines in rat heart cells. *Journal of Physiology-London*. 1996 Nov 15; 497(1): 31-8.
- [84] Kocksamper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA. Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophysical journal*. 2001 Nov; 81(5): 2590-605.

- [85] Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Ball WJ, Vaghy PL, et al. IMMUNOLOCALIZATION OF SARCOLEMMA DIHYDROPYRIDINE RECEPTOR AND SARCOPLASMIC RETICULAR TRIADIN AND RYANODINE RECEPTOR IN RABBIT VENTRICLE AND ATRIUM. *Journal of Cell Biology*. 1995 May; 129(3): 673-82.
- [86] Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996 Jan; 270(1): C148-C59.
- [87] Izu LT, Wier WG, Balke CW. Evolution of cardiac calcium waves from stochastic calcium sparks. *Biophysical journal*. 2001 Jan; 80(1): 103-20.
- [88] Keizer J, Smith GD, Ponce-Dawson S, Pearson JE. Saltatory propagation of Ca^{2+} waves by Ca^{2+} sparks. *Biophysical journal*. 1998 Aug; 75(2): 595-600.
- [89] Brum G, Gonzalez A, Rengifo J, Shirokova N, Rios E. Fast imaging in two dimensions resolves extensive sources of Ca^{2+} sparks in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology-London*. 2000 Nov 1; 528(3): 419-33.
- [90] Cheng H, Lederer MR, Xiao RP, Gomez AM, Zhou YY, Ziman B, et al. Excitation-contraction coupling in heart: New insights from Ca^{2+} sparks. *Cell calcium*. 1996 Aug; 20(2): 129-40.
- [91] Lakatta EG, Guarnieri T. SPONTANEOUS MYOCARDIAL CALCIUM OSCILLATIONS - ARE THEY LINKED TO VENTRICULAR-FIBRILLATION. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1993 Aug; 4(4): 473-89.
- [92] Boyden PA, Pu JL, Pinto J, ter Keurs H. Ca^{2+} transients and Ca^{2+} waves in Purkinje cells - Role in action potential initiation. *Circulation research*. 2000 Mar 3; 86(4): 448-55.
- [93] Boyden PA, Barbhaiya C, Lee T, ter Keurs H. Nonuniform Ca^{2+} transients in arrhythmogenic Purkinje cells that survive in the infarcted canine heart. *Cardiovascular research*. 2003 Mar; 57(3): 681-93.
- [94] Katta RP, Laurita KR. Cellular mechanism of calcium-mediated triggered activity in the heart. *Circulation research*. 2005 Mar 18; 96(5): 535-42.
- [95] Schwarzfeld TA, Jacobson SL. ISOLATION AND DEVELOPMENT IN CELL-CULTURE OF MYOCARDIAL-CELLS OF THE ADULT-RAT. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1981 1981; 13(6): 563-75.
- [96] Haddad J, Decker ML, Hsieh LC, Lesch M, Samarel AM, Decker RS. ATTACHMENT AND MAINTENANCE OF ADULT-RABBIT CARDIAC MYOCYTES IN PRIMARY-CELL CULTURE. *American Journal of Physiology*. 1988 Jul; 255(1): C19-C27.
- [97] Dubus I, Samuel JL, Marotte F, Delcayre C, Rappaport L. BETA-ADRENERGIC AGONISTS STIMULATE THE SYNTHESIS OF NONCONTRACTILE BUT NOT CONTRACTILE PROTEINS IN CULTURED MYOCYTES ISOLATED FROM ADULT-RAT HEART. *Circulation research*. 1990 Mar; 66(3): 867-74.
- [98] Spahr R, Jacobson SL, Siegmund B, Schwartz P, Piper HM. SUBSTRATE OXIDATION BY ADULT CARDIOMYOCYTES IN LONG-TERM PRIMARY CULTURE. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1989 Feb; 21(2): 175-85.
- [99] Leach RN, Desai JC, Orchard CH. Effect of cytoskeleton disruptors on L-type Ca channel distribution in rat ventricular myocytes. *Cell calcium*. 2005 Nov; 38(5): 515-26.
- [100] Louch WE, Bito V, Heinzel FR, Macianskiene R, Vanhaecke J, Flameng W, et al. Reduced synchrony of Ca^{2+} release with loss of T-tubules - a comparison to Ca^{2+} release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2004 Apr; 62(1): 63-73.
- [101] Gorelik J, Yang LQ, Zhang YJ, Lab M, Korchev Y, Harding SE. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. *Cardiovascular research*. 2006 Dec; 72(3): 422-9.
- [102] Clark RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C. T-tubule localization of the inward-rectifier K^+ channel in mouse ventricular myocytes: a role in K^+ accumulation. *Journal of Physiology-London*. 2001 Dec 15; 537(3): 979-92.

- [103] Brette F, Orchard C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circulation research*. 2003 Jun 13; 92(11): 1182-92.
- [104] Komukai K, Brette F, Yamanushi TT, Orchard CH. K⁺ current distribution in rat sub-epicardial ventricular myocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 2002 Jul; 444(4): 532-8.
- [105] Brette F, Salle L, Orchard CH. Quantification of calcium entry at the T-tubules and surface membrane in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*. 2006 Jan; 90(1): 381-9.
- [106] Pasek M, Simurda J, Christe G, Orchard CH. Modelling the cardiac transverse-axial tubular system. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 2008 Jan-Apr; 96(1-3): 226-43.
- [107] Yuan WL, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1996 Jun 15; 493(3): 733-46.
- [108] Arreola J, Dirksen RT, Shieh RC, Williford DJ, Sheu SS. CA²⁺ CURRENT AND CA²⁺ TRANSIENTS UNDER ACTION-POTENTIAL CLAMP IN GUINEA-PIG VENTRICULAR MYOCYTES. *American Journal of Physiology*. 1991 Aug; 261(2): C393-C7.
- [109] Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. TRANSIENT OUTWARD CURRENT IN HUMAN VENTRICULAR MYOCYTES OF SUBEPICARDIAL AND SUBENDOCARDIAL ORIGIN. *Circulation research*. 1994 Sep; 75(3): 473-82.
- [110] Shieh RC, Chang JC, Arreola J. Interaction of Ba²⁺ with the pores of the cloned inward rectifier K⁺ channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophysical journal*. 1998 Nov; 75(5): 2313-22.
- [111] Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca²⁺-induced inward rectification of K⁺ current during the ventricular action potential. *Circulation research*. 1998 May 18; 82(9): 947-56.
- [112] Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca²⁺-dependent reduction of I-K1 in rat ventricular cells: A novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovascular research*. 2005 Nov; 68(2): 204-12.
- [113] Hua F, Gilmour RF. Contribution of I-Kr to rate-dependent action potential dynamics in canine endocardium. *Circulation research*. 2004 Apr 2; 94(6): 810-9.
- [114] Rocchetti M, Besana A, Gurrola GB, Possani LD, Zaza A. Rate dependency of delayed rectifier currents during the guinea-pig ventricular action potential. *Journal of Physiology-London*. 2001 Aug 1; 534(3): 721-32.
- [115] Han W, Wang ZG, Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001 Mar; 280(3): H1075-H80.
- [116] Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of I-Kr and I-Ks heterogeneity on action potential duration and its rate dependence - A simulation study. *Circulation*. 1999 May 11; 99(18): 2466-74.
- [117] Rocchetti M, Freli V, Perego V, Altomare C, Mostacciolo G, Zaza A. Rate dependency of beta-adrenergic modulation of repolarizing currents in the guinea-pig ventricle. *Journal of Physiology-London*. 2006 Jul 1; 574(1): 183-93.
- [118] Hondeghem LM, Snyders DJ. CLASS-III ANTIARRHYTHMIC AGENTS HAVE A LOT OF POTENTIAL BUT A LONG WAY TO GO - REDUCED EFFECTIVENESS AND DANGERS OF REVERSE USE DEPENDENCE. *Circulation*. 1990 Feb; 81(2): 686-90.
- [119] Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. RATE-DEPENDENT PROLONGATION OF CARDIAC ACTION-POTENTIALS BY A METHANESULFONANILIDE CLASS-III ANTIARRHYTHMIC AGENT - SPECIFIC BLOCK OF RAPIDLY ACTIVATING DELAYED RECTIFIER K⁺-CURRENT BY DOFETILIDE. *Circulation research*. 1993 Jan; 72(1): 75-83.
- [120] Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan CV, Lazzara R. Role of Na⁺:Ca²⁺ exchange current in Cs(+)-induced early afterdepolarizations in Purkinje fibers. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1994 Nov; 5(11): 933-44.

- [121] Zeng JL, Rudy Y. EARLY AFTERDEPOLARIZATIONS IN CARDIAC MYOCYTES - MECHANISM AND RATE DEPENDENCE. *Biophysical journal*. 1995 Mar; 68(3): 949-64.
- [122] Zygmunt AC. INTRACELLULAR CALCIUM ACTIVATES A CHLORIDE CURRENT IN CANINE VENTRICULAR MYOCYTES. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1994 Nov; 267(5): H1984-H95.
- [123] Newman JRS, Ghaemmaghami S, Ihmels J, Breslow DK, Noble M, DeRisi JL, et al. Single-cell proteomic analysis of *S-cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature*. 2006 Jun; 441(7095): 840-6.
- [124] Feinerman O, Veiga J, Dorfman JR, Germain RN, Altan-Bonnet G. Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science*. 2008 Aug; 321(5892): 1081-4.
- [125] Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*. 2009 May; 459(7245): 428-U144.
- [126] Sigal A, Milo R, Cohen A, Geva-Zatorsky N, Klein Y, Liron Y, et al. Variability and memory of protein levels in human cells. *Nature*. 2006 Nov; 444(7119): 643-6.
- [127] Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttill RA, Dolle MET, et al. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature*. 2006 Jun; 441(7096): 1011-4.
- [128] Babnigg G, Heller B, Villereal ML. Cell-to-cell variation in store-operated calcium entry in HEK-293 cells and its impact on the interpretation of data from stable clones expressing exogenous calcium channels. *Cell calcium*. 2000 Feb; 27(2): 61-73.
- [129] Niepel M, Spencer SL, Sorger PK. Non-genetic cell-to-cell variability and the consequences for pharmacology. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009 Dec; 13(5-6): 556-61.
- [130] Huh D, Paulsson J. Non-genetic heterogeneity from stochastic partitioning at cell division. *Nature Genetics*. Feb; 43(2): 95-U32.
- [131] Horvath B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nanasi PP, Banyasz T. Contribution of I-Ks to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 2006 Sep; 452(6): 698-706.
- [132] Yang T, Roden DM. Extracellular potassium modulation of drug block of I-Kr - Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation*. 1996 Feb 1; 93(3): 407-11.
- [133] Hondeghem LM, Katzung BG. ANTIARRHYTHMIC AGENTS - THE MODULATED RECEPTOR MECHANISM OF ACTION OF SODIUM AND CALCIUM CHANNEL-BLOCKING DRUGS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1984 1984; 24: 387-423.
- [134] Gintant GA. Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle - Does I-Ks play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circulation research*. 1996 Jan; 78(1): 26-37.
- [135] Gintant GA. Characterization and functional consequences of delayed rectifier current transient in ventricular repolarization. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000 Mar; 278(3): H806-H17.
- [136] Weber CR, Piacentino V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na⁺-Ca²⁺ exchange current and submembrane [Ca²⁺] during the cardiac action potential. *Circulation research*. 2002 Feb 8; 90(2): 182-9.
- [137] Lukyanenko V, Gyorke S. Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1999 Dec 15; 521(3): 575-85.
- [138] Huser J, Lipsius SL, Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1996 Aug 1; 494(3): 641-51.
- [139] Woo SH, Cleemann L, Morad M. Spatiotemporal characteristics of junctional and nonjunctional focal Ca²⁺ release in rat atrial myocytes. *Circulation research*. 2003 Jan 10; 92(1): E1-E11.
- [140] Satoh H, Blatter LA, Bers DM. Effects of [Ca²⁺]_i, SR Ca²⁺ load, and rest on Ca²⁺ spark frequency in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1997 Feb; 272(2): H657-H68.

- [141] Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling - The role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circulation research*. 2004 Feb 20; 94(3): 296-305.
- [142] Izu LT, Means SA, Shadid JN, Chen-Izu Y, Balke CW. Interplay of ryanodine receptor distribution and calcium dynamics. *Biophysical journal*. 2006 Jul; 91(1): 95-112.
- [143] Izu LT, Mauban JRH, Balke CW, Wier WG. Large currents generate cardiac Ca²⁺ sparks. *Biophysical journal*. 2001 Jan; 80(1): 88-102.
- [144] Banyasz T, Chen-Izu Y, Balke CW, Izu LT. A new approach to the detection and statistical classification of Ca²⁺ sparks. *Biophysical journal*. 2007 Jun; 92(12): 4458-65.
- [145] Silverman BW. *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. 1 ed. London: Chapman and Hall; 1986.